

Untersuchung zur Biogenese von Globin-mRNA aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ulrich Grundmann

aus Berlin

1977



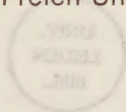
Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549022_0019

Untersuchung zur Biogenese von Globin-mRNA aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Ulrich Grundmann

aus Berlin

1977

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann

Korreferent: Prof. Dr. E.-R. Lochmann



Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 1977

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Dr. H. Tiedemann und Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. W. Knöchel am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann bin ich für die zahlreichen Ratschläge zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt besonders Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. W. Knöchel, der mir durch sein stetes Interesse an der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft eine große Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit war.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich Embryonale Entwicklung und Differenzierung) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Im Text gebrauchte Abkürzungen:

RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
tRNA	transfer-Ribonucleinsäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
cDNA	Copy-Desoxyribonucleinsäure
mRNP	messenger-Ribonucleoproteinkomplex
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Hepes	N'-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Sedimentationskonstante in Svedbergeinheiten (S): $S = 10^{-13} \text{ sec}$
rpm	Umdrehungen pro Minute
cpm	Impulse pro Minute
PPO	2,5 - Diphenyloxazol
POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyl-oxazolyl)-Benzol
TMED	N,N,N'NN'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>ZIEL DER ARBEIT</u>	5
3. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	6
3.1 Isolierung von Kern-RNA	6
3.1.1 Isolierung von unreifen roten Hühnerblutzellen	6
3.1.2 Gewinnung der Zellkerne	6
3.1.3 Extraktion der Kern-RNA	7
3.1.4 Reinigung der Kern-RNA durch DNAase-Behandlung	8
3.2 Auftrennung der Kern-RNA nach ihrem Poly(A)-Gehalt durch Poly(U)-Sepharose	8
3.3 Isolierung von Poly(A)-haltiger 9 S Globin-mRNA	9
3.3.1 Isolierung der 9 S RNA Fraktion	9
3.3.2 Auftrennung der 9 S RNA nach ihrem Poly(A)-Gehalt durch Oligo(dT)-Cellulose	10
3.4 Markierung von 9 S Globin-mRNA mit ^{125}Jod	11
3.5 Isolierung von polysomaler RNA	11
3.6 Auftrennung der Kern-RNA in Formamid	12
3.6.1 Formamid-Saccharose-Gradienten	12
3.6.2 Elektrophorese auf exponentiellen Polyacrylamid-Gelen in Formamid	13
3.7 Synthese von ^3H -markierter cDNA	15
3.8 Hybridisierung von RNA mit ^3H -Poly(U) und ^3H -markierter cDNA	16
3.8.1 Hybridisierungsreaktion mit ^3H -Poly(U)	16

	<u>Seite</u>
3.8.2	Hybridisierungsreaktion mit ^3H -markierter cDNA 17
3.9	Isolierung von ^3H -markierter Kern-RNA 18
3.10	Synthese von unmarkierter Globin-cDNA 18
3.11	Hybridisierungsreaktion mit der unmarkierten Globin-cDNA 20
3.12	Isolierung von Poly(A)-Sequenzen aus RNA-Molekülen mit Globinsequenzen von ^3H -Adenosin markierter Kern-RNA 20
3.12.1	Abtrennung der Hybride von einzelsträngiger, degradiert RNA durch Hydroxylapatit 20
3.12.2	Analyse der Poly(A)-Sequenzen 21
3.13	Bestimmung von c_{ro} -t-Werten 22
3.14	Untersuchung auf " Leberprotein" codierende Sequenzen in den RNA-Fraktionen aus unreifen roten Blutzellen 23
3.14.1	Präparation des Leber-Zellextraktes 23
3.14.2	Isolierung der polysomalen Poly(A)-haltigen " Leberprotein-mRNA " 23
3.14.3	Synthese und Hybridisierungsreaktion von ^3H -markierter " Leberprotein-cDNA " 24
3.15	Translation der RNA-Fraktionen aus unreifen roten Hühnerblutzellen im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen 24
3.15.1	Präparation des zellfreien Systems 24
3.15.2	Präparation einer ribosomalen Waschfraktion 25
3.15.3	Translation der RNA 25
3.16	Isolierung von Globinketten als Referenz-substanz 26
3.17	Produktanalyse der zellfreien Proteinbiosynthese 27
3.17.1	Gelfiltration über Sephadex G 100 27
3.17.2	Chromatographie an Carboxymethylcellulose 27

	<u>Seite</u>
3.17.3	Analyse der tryptischen Peptide 28
3.17.3.1	Perameisensäure Oxydation 28
3.17.3.2	Tryptische Verdauung 28
3.17.3.3	Peptidanalyse 28
3.18	Messung der Radioaktivität 29
3.18.1	Messung von Trichloressigsäure fällbarem Material 29
3.18.2	Messung in wässrigen Lösungen 29
3.19	Lösungen und Puffer 31
3.20	Chemikalien 32
4.	<u>ERGEBNISSE</u> 34
4.1	Isolierung von RNA-Spezies aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern 34
4.1.1	Isolierung der Kern-RNA 34
4.1.2	Isolierung der polysomalen RNA und der 9 S Globin-mRNA 35
4.2	Synthese von ³ H-markierter Globin-cDNA 38
4.3	Größenverteilung der Globin codierenden Sequenzen und der Poly(A)-Sequenzen in steady state RNA aus Zellkernen und Polysomen 39
4.3.1	Auftrennung in Formamid-Saccharose-Gradienten 39
4.3.2	Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in hoch- und niedermolekularer steady state Kern-RNA durch Sättigungshybridisierung 41
4.3.3	Translation von Kern-RNA (< 20 S und > 20 S) im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen 44
4.3.3.1	Proteinbiosynthese 44
4.3.3.2	Produktanalyse 45
4.3.4	Auftrennung auf exponentiellen Polyacrylamid-Gelen in Formamid 46

	<u>Seite</u>
4.4	Größenverteilung der Globin codierenden Sequenzen in neusynthetisierter RNA aus Zellkernen 52
4.5	Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in neusynthetisierter Poly(A) ⁺ und Poly(A) ⁻ Kern-RNA 55
4.5.1	Auftrennung von RNA nach dem Poly(A)-Gehalt durch Poly(U)-Sephrose Chromatographie 55
4.5.2	Auftrennung der ³ H-pulsmarkierten Kern-RNA in Poly(A) ⁺ und Poly(A) ⁻ 57
4.6	Analyse der Poly(A)-Sequenzen in Molekülen der Globin codierenden 15 S Kern-RNA 58
4.6.1	Isolierung der RNA-DNA Hybride 58
4.6.2	Auftrennung der Poly(A)-Sequenzen im Gradienten 61
4.7	Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in Poly(A) ⁺ und Poly(A) ⁻ steady state Kern-RNA 65
4.7.1	Bestimmung der c _{ro} -t-Werte 65
4.7.2	Translation der RNA im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen 68
4.7.2.1	Proteinbiosynthese 68
4.7.2.2	Produktanalyse 69
4.8	Gehalt an Protein codierenden Sequenzen, die in Leberzellen und unreifen roten Blutzellen vorkommen 71
5.	<u>DISKUSSION</u> 75
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u> 86
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u> 89

1. EINLEITUNG

Zum Verständnis der Regulation der Genexpression in Zellen von Eukaryonten ist es von großer Bedeutung, die Biogenese von mRNA zu untersuchen. Arbeiten von Georgiev et al.¹ und K. Scherrer et al.² führten 1963 zu der Vermutung, daß im Zellkern der Eukaryonten eine RNA-Spezies existiert, die nicht mit der ribosomalen RNA und deren Vorläufermolekülen, sondern vielmehr mit der cytoplasmatischen mRNA verwandt ist. Diese Kern-RNA, die im Saccharose-Gradienten eine sehr heterogene Verteilung mit Sedimentationswerten bis 100 S zeigt und deswegen "heterogeneous nuclear RNA" (HnRNA) genannt wurde, hat folgende, mit der mRNA vergleichbare Eigenschaften:

- 1] Die Basenzusammensetzung entspricht der DNA, die nicht die ribosomale RNA codiert. Der G+C-Gehalt liegt bei 44 % im Gegensatz zu 66 % bei der ribosomalen RNA (R. Soeiro et al.³).
- 2] Die Halbwertszeit im Bereich von 3 min bis zu einer Stunde ist sehr kurz (R. Soeiro et al.⁴, S. Penman et al.⁵).
- 3] Durch den schnellen Einbau radioaktiv markierter Nukleoside kann sie von ribosomaler RNA unterschieden und identifiziert werden (J. E. Darnell et al.⁶).
- 4] Sie enthält Sequenzen der nicht-repetitiven DNA (J. R. Greenberg und R. P. Perry⁷).
- 5] Am 3'-OH Ende der Nukleotidkette besitzt sie Poly(A)-Sequenzen mit einer Länge bis zu 200 Nukleotiden (M. Edmonds et al.⁸, J. R. Greenberg und R. P. Perry⁹, J. E. Darnell et al.¹⁰).
- 6] Ein Teil der Moleküle enthält am 5'-Ende der Nukleotidkette methylierte Gruppen, sogenannte "capping groups" (R. P. Perry und D. E. Kelley¹¹, R. P. Perry und D. E. Kelley¹², Y. Furuichi et al.¹³).

Auf Grund dieser Eigenschaften wurde eine Vorläufer-Produkt-Beziehung postuliert, wonach die mRNA ein Folgeprodukt der HnRNA ist und aus ihr als ein Teilstück hervorgeht (R. Soerio et al.⁴, Edmonds et al.⁸, J. E. Dar-

nell¹⁴, J.E.Darnell et al.¹⁵). Dieser Vorgang wurde "Processing" genannt.

Das zentrale Dogma der Proteinbiosynthese, das die Beziehung zwischen DNA und Proteinen deutlich machen sollte, könnte somit erweitert werden. Neben der Regulation auf der Stufe der Transcription, wie sie von F.Jacob und J.Monod¹⁶ für Bakterien gefunden wurde, und auf der Stufe der Translation würde sich die Modifikation der bereits transkribierten RNA (das post-transcriptionelle Processing) als dritte Kontrollmöglichkeit bei der Informationsübertragung ergeben (M.Edmonds et al.⁸, J.E.Darnell et al.¹⁵, J.E.Darnell et al.¹⁷).

Nachweise für eine Vorläufer-Produkt-Beziehung zwischen der HnRNA und der mRNA schienen erstmals 1973 erbracht worden zu sein, als es gelang, die höhermolekulare RNA aus dem Zellkern erythropoetischer Gewebe mit einer Copy-DNA (cDNA), die der Globin-mRNA komplementär war, zu hybridisieren (T.Imaizumi et al.¹⁸). Außerdem berichteten R.Williamson et al.²⁰ und A.Ruiz-Carillo et al.¹⁹ über Translationsexperimente, durch welche die Existenz von hochmolekularen Globin codierenden Sequenzen in Zellkernen von fetalen Leberzellen aus Mäusen und von Erythroblasten aus Enten nachgewiesen zu sein schien.

Trotz dieser Befunde, die das Vorhandensein höhermolekularer mRNA-Precursor-Moleküle (Vorläufer-Moleküle) in der HnRNA zu bestätigen schienen, kamen Zweifel an der Existenz dieser Moleküle auf. Für die mRNA von Ovalbumin und Seidenfibroin konnten keine größeren Vorstufen gefunden werden (G.S.McKnight und R.T.Schimke²¹, P.M.Lizardi²²). Ferner war die Menge der mutmaßlichen Precursor-Moleküle für Globin-mRNA sehr gering (T.Imaizumi et al.¹⁸). Schließlich weist niedermolekulare mRNA eine Tendenz zur Bildung von Aggregaten mit anderen RNA-Spezies auf (D.Kabat²³). Somit war die Möglichkeit, daß es sich bei den beschriebenen mRNA-Vorläufer-Molekülen um artifizielle Aggregate handelte, nicht auszuschließen. Einige Autoren versuchten diese Schwierigkeit zu umgehen, indem sie die Kern-RNA in Dimethylsulfoxid-Gradienten

ten auftrennten (T. Imaizumi et al.¹⁸, A. Ruiz-Carillo et al.¹⁹, W. Knöchel und H. Tiedemann²⁴). Neuere Ergebnisse haben jedoch gezeigt, daß auch in Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel Wechselwirkungen zwischen RNA-Molekülen nicht vollständig unterdrückt werden können (S.R. de Kloet et al.²⁵, J.A. Maxwell²⁶). Die Frage nach der Existenz des hochmolekularen mRNA-Precursors blieb somit ungelöst.

Zur weiteren Klärung der Frage, ob ein Precursor für Globin-mRNA existiert, wurde deshalb die Kern-RNA aus unreifen roten Hühnerblutzellen in Formamid als denaturierendem Lösungsmittel durch Saccharose-Gradientenzentrifugation und Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Durch Hybridisierung mit einer der Globin-mRNA komplexitären DNA (cDNA) sollte die Größenverteilung der Globin codierenden Sequenzen in der Kern-RNA ermittelt werden. Hybridisierungen mit Poly(U) sollten ferner Aufschluß über die Verteilung der Poly(A)-Sequenzen geben. Beide Versuchsanordnungen dienten der Frage, ob und in welchem Ausmaß Precursor-Moleküle der 9 S Globin-mRNA im Zellkern existieren.

Die Tatsache, daß sowohl mRNA im Cytoplasma als auch die RNA des Zellkerns Poly(A)-Sequenzen besitzt und 90 % der HnRNA nicht in das Cytoplasma gelangen, ließ vermuten, daß eine gewisse Selektion bei der Auswahl der zur Translation bestimmten Sequenzen durch Poly(A) stattfindet (R. Soeiro et al.⁴, J.E. Darnell et al.⁶).

Arbeiten, bei denen die RNA-Synthese in Abhängigkeit von Actinomycin D untersucht wurde - Actinomycin D hemmt die DNA abhängige RNA-Synthese - zeigten, daß bei hoher Dosis zwar die Transcription der HnRNA gehemmt wird, daß aber die post-transcriptionelle Polyadenylierung nur wenig beeinflusst wird (J.E. Darnell et al.⁶). Umgekehrt wird aber die Poly(A)-Synthese in Gegenwart von Cordicepin (3'-Desoxyadenosin) gehemmt, dagegen nicht die Synthese der HnRNA (S. Penman et al.²⁷). Möglicherweise könnte dabei eine an das Chromatin gebundene Poly(A)-Polymerase eine Rolle spielen, die in vitro durch 3'-Desoxyadenosintriphosphat gehemmt

werden soll (K. M. Rose et al.²⁸, S. G. Sawicki et al.²⁹). Eindeutige Angaben über die Funktion der Poly(A)-Sequenzen als mögliche Erkennungssignale beim post-transcriptionellen Processing konnten jedoch bis heute nicht gemacht werden (M. Edmonds et al.⁸, Nature³⁰).

Von verschiedenen Autoren wurde gezeigt, daß die Poly(A)-Sequenzen der mRNA nach mehreren Translationsschritten kürzer werden (D. Sheiness und J. E. Darnell³¹, R. E. Pemberton und C. Baglioni³², G. Huez et al.³³); dennoch kann mRNA auch ohne Poly(A) translatiert werden (E. Bard et al.³⁴, R. F. Munoz und J. E. Darnell³⁵). Die bisher einzig bekannte Ausnahme ist Histon-mRNA, die überhaupt keine Poly(A)-Sequenzen besitzt und schneller ins Cytoplasma transportiert wird als der Hauptanteil der anderen mRNA Spezies (M. Adesnik et al.³⁶). Somit wird auch eine Beteiligung der Poly(A)-Sequenzen bei der Regulation auf der Stufe der Translation unwahrscheinlich.

Zur Untersuchung, ob die Polyadenylierung der RNA bei der Selektion zu translatierender Sequenzen von Bedeutung ist, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit Kern-RNA aus den unreifen roten Blutzellen nach dem Poly(A)-Gehalt durch Poly(U)-Sephrose Chromatographie in Poly(A)⁺ und Poly(A)⁻ RNA aufgetrennt und anschließend im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen translatiert. Das Ausmaß der durch diese RNA-Fractionen bewirkten Globinsynthese wurde mit Kontrollversuchen verglichen, bei denen polysomale RNA und Globin-mRNA translatiert wurde. Der Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in diesen RNA-Fractionen aus dem Zellkern und dem Cytoplasma wurde durch Hybridisierung mit Globin-cDNA direkt ermittelt.

2. ZIEL DER ARBEIT

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, zur Klärung von zwei die genetische Expression betreffenden Fragen beizutragen. Einmal sollte untersucht werden, ob die Kern-RNA tatsächlich höhermolekulare Vorstufen für cytoplasmatische mRNA aufweist, zum anderen, ob die im Zellkern stattfindende post-transcriptionelle Polyadenylierung eine Funktion bei der Selektion zu translatierender Sequenzen besitzt. Als Material dienten unreife rote Blutzellen von Hühnern. Unreife rote Blutzellen haben für biochemische Untersuchungen den grossen Vorzug, daß sie vorwiegend eine einzige Klasse von Proteinen (Globin) synthetisieren. Die Isolierung und Untersuchung einer spezifischen mRNA - in diesem Fall der Globin-mRNA - wird dadurch vereinfacht.

Kern-RNA sollte in Formamid als denaturierendem Lösungsmittel durch Gradientenzentrifugation und Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt werden. Die anschließende Hybridisierung mit einer in vitro synthetisierten, der Globin-mRNA komplementären DNA (cDNA) sowie mit Poly(U) ermöglicht eine Aussage über die Größenverteilung der Globin codierenden Sequenzen und der Poly(A)-Sequenzen in Kern-RNA Molekülen verschiedener Größe.

Zur Klärung der Frage, ob durch das Anfügen von Poly(A)-Sequenzen eine Selektion der zu translatierenden Sequenzen stattfindet, wurde Kern-RNA nach ihrem Poly(A)-Gehalt durch Poly(U)-Sephrose Chromatographie in Poly(A)⁺ und Poly(A)⁻ RNA aufgetrennt. Der Gehalt an Globin codierenden Sequenzen wurde durch Hybridisierung mit Globin-cDNA ermittelt. Das Ausmaß der durch diese RNA-Fractionen bewirkten Globin-synthese wurde schließlich durch Translation in einem zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen mit anschließender Produktanalyse weiter charakterisiert. Hierbei konnte der prozentuale Anteil an Globinketten im Verhältnis zur gesamten (in vitro) Proteinsynthese bestimmt werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Isolierung von Kern-RNA

3.1.1 Isolierung von unreifen roten Hühnerblutzellen

Zur Gewinnung der unreifen roten Blutzellen dienten ca. 1 Jahr alte Hühner der Rasse " Weißes Leghorn " (Gewicht 1 - 1,5 kg). Die Tiere wurden anämisch gemacht, indem ihnen an vier aufeinanderfolgenden Tagen 10 mg/kg Phenylhydrazin (2,5 %, pH 7.5) subkutan injiziert wurde. (H.Schall und F. Turba³⁷). Nach einem Ruhetag wurden die Hühner am sechsten Tag mit Äther narkotisiert. Um die Blutgerinnung im Körper während des Entblutens zu vermeiden, wurde den Tieren 1 ml Heparin (10 mg/ml) in die freipräparierte Jugularisvene injiziert. Nach Abwarten der Kreislaufzeit wurde die Vene durchtrennt und das Blut in 1/10 Volumen (bezogen auf ein zu erwartendes Blutvolumen von 60 ml) einer 5 % Natriumcitratlösung aufgefangen.

Alle folgenden Arbeiten wurden in der Kälte oder im Eisbad durchgeführt. Das Blut wurde 10 min in einer Christ Kühlzentrifuge bei 1 500 g zentrifugiert. Das Plasma und die über den roten Zellen liegende Schicht weißer Blutzellen wurden mit einer Pasteurpipette unter Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Die roten Blutzellen wurden im dreifachen Volumen Puffer 1 aufgenommen, gut durchmischt und wieder 10 min bei 1 500 g abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt.

3.1.2 Gewinnung der Zellkerne

Zur Lysis wurden die sedimentierten Zellen im fünffachen Volumen Puffer 2 aufgenommen und 5 min gerührt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Puffer 3 (bezogen auf das Volumen Puffer 2) wurde die Lösung zur quan-

titativen Zerstörung der Zellen mit einem locker eingepaßten Dounce Homogenisator mit 5 - 6 Strokes nachhomogenisiert. Um die Zellkerne zu sedimentieren, wurde das Homogenat bei 0°C und 12 000 rpm im Spinco Al 30 Rotor 10 min zentrifugiert. Der postmitochondriale Überstand wurde abgehoben und die Zellkerne noch einmal mit Triton X 100 (Endkonzentration: 0,5 %) gewaschen.

3.1.3 Extraktion der Kern-RNA (J.R. Warner et al.³⁸)

Die Zellkerne wurden im vierfachen Volumen (Volumen/Gewicht) Puffer 4 aufgenommen, 1 % an SDS gemacht und mit gleichem Volumen frisch destilliertem Phenol (80 %) versetzt. Die Emulsion wurde bei Raumtemperatur 10 min leicht gerührt und danach in der Sorvall RC 5 Superspeed bei 8°C und 12 000 rpm 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgehoben und die Phenolphase mit halbem Volumen Puffer 4 und 1 % SDS versetzt. Das Gemisch wurde bei 65°C im Wasserbad 5 min gerührt, um die fädigen bis gelartigen DNA-Anteile aufzulösen. Nach Abkühlen auf 8°C wurde das Gemisch wieder 10 min bei 12 000 rpm zentrifugiert, die wässrige Phase abgehoben und mit der ersten vereinigt. Die gesammelten wässrigen Phasen wurden mit halbem Volumen Phenol (80 %) versetzt und noch so lange nachextrahiert, bis keine Mittelschicht zwischen beiden Phasen mehr auftrat. Nach Zugabe von 2 % NaCl wurde das Material in der wässrigen Phase mit zwei Volumen 96 % Äthanol bei -20°C gefällt. Das Sediment wurde 30 min bei 0°C zentrifugiert, zweimal in 66 % Äthanol mit 0,5 % NaCl und einmal in 66 % Äthanol/Äther (2 : 1) gewaschen und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet.

3.1.4 Reinigung der Kern-RNA durch DNAase-Behandlung

Die sedimentierte RNA wurde in Puffer 5 auf eine Konzentration von 2-3 mg/ml gebracht und nach Zugabe von DNAase I (0,1 mg/ml) 3 min bei 37°C inkubiert (D.S.Holmes und J.Bonner³⁹). Der Abbau wurde durch SDS (Endkonzentration: 1 %) und EDTA (Endkonzentration: 1 mM) im Eisbad gestoppt. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (50 : 50 : 1), um das Enzym von der Kern-RNA zu trennen (H.Aviv und P. Leder⁴⁰). Die Extraktion wurde zwei- bis dreimal wiederholt, bis keine Mittelschicht mehr auftrat. Die Kern-RNA wurde nach Zugabe von 2 % NaCl mit zwei Volumen 96 % Äthanol bei -20°C gefällt. Nach zweimaligem Waschen in 66 % Äthanol, 0,5 % NaCl und 66 % Äthanol/Äther (2 : 1) wurde sie in H₂O gelöst und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2 Auftrennung der Kern-RNA nach ihrem Poly(A)-Gehalt durch Poly(U)-Sephrose (U.Lindberg und T. Person⁴¹)

Für die Auftrennung der sehr komplex strukturierten Kern-RNA nach ihrem Poly(A)-Gehalt erwies sich die Anwendung von Poly(U)-Sephrose 4B [Pharmacia] mit denaturierend wirkenden Formamid-Puffern vorteilhaft. Es wurde eine Pasteurpipette von 2 ml Inhalt mit 0,4 mg Poly(U)-Sephrose 4B, die zuvor mit 1 M und 0,1 M NaCl Lösung gewaschen wurde, gefüllt. Die Säule wurde zunächst mit 40 ml Puffer 8 (90 % Formamid) und 40 ml Puffer 6 (25 % Formamid) äquilibriert. Die gesamte Elution erfolgte bei Raumtemperatur.

4 mg Kern-RNA wurden in 2 ml 1 % Lauroyl-Sarcosin und 30 mM EDTA gelöst, mit fünffachem Volumen Puffer 6 verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte zuerst mit Puffer 6, danach mit Puffer 7 (50 % Formamid) und schließlich, um die an die Poly(U)-Sephrose gebundene, Poly(A)-haltige RNA abzutrennen, mit Puffer 8. Wegen

der hohen Eigenextinktion von Formamid war eine kontinuierliche Extinktionsmessung der Eluate nicht möglich.

Alle drei Eluate wurden getrennt aufgefangen und mit 96 % Äthanol, 2 % K-acetat bei -20°C gefällt. Um schwerlösliches K-phosphat aus der Poly(A)^+ Kern-RNA Fraktion zu eliminieren, wurde die RNA nach der Fällung über eine Sephadex G 25 Säule (25 x 0,9 cm) bei 0°C in 10 mM NaCl entsalzt und erneut gefällt.

3.3 Isolierung von Poly(A)-haltiger 9 S Globin-mRNA

3.3.1 Isolierung der 9 S RNA Fraktion

Der postmitochondriale Überstand aus lysierten, unreifen roten Blutzellen (siehe Kapitel 3.1.2) wurde im Spinco Ti 60 Rotor bei 50 000 rpm und 0°C 2 Stunden zentrifugiert. Die Unterschichtung mit einem Kissen von 2 ml 0,8 M Saccharose in Puffer 9 bewirkte, daß die Polysomen weitgehend frei von Verunreinigungen mit anderen cytoplasmatischen Bestandteilen waren. Die Polysomen wurden in Puffer 10 aufgenommen und 30 mM an EDTA gemacht. Das Material, das dadurch in ribosomale Untereinheiten und den mRNP-Komplex dissoziierte, wurde durch einen 7-32 % Saccharosegradienten in Puffer 10 im Spinco Zonal Rotor Ti 14 bei 32 000 rpm und 0°C für 24 Stunden zentrifugiert. Die Extinktion des Gradienten bei 254 nm wurde beim Eluieren kontinuierlich gemessen.

Fractionen, die den mRNP-Komplex enthielten, wurden vereinigt, mit SDS (Endkonzentration: 1 %) und NaCl (Endkonzentration: 1,5 %) versetzt und mit 2 Volumen 96 % Äthanol gefällt. Das Präzipitat wurde im Spinco SW 27 Rotor durch einen 12 - 30 % Saccharosegradienten in Puf-

fer 10 45 Stunden bei 27 000 rpm und 0°C zentrifugiert. Nach Extinktionsmessung und Fraktionierung des Gradienten wurde das bei 9 - 10 S sedimentierende Material vereinigt und einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (siehe Kapitel 3.1.4) unterworfen. Die 9 S RNA wurde mit zwei Volumen 96 % Äthanol und 2 % NaCl gefällt, zweimal in 66 % Äthanol, 0.5 % NaCl und einmal in 66 % Äthanol/Äther (2 : 1) gewaschen. Die RNA wurde im Vakuum der Ölpumpe getrocknet und in Puffer 11 gelöst.

3.3.2 Auftrennung der 9 S RNA nach ihrem Poly(A)-Gehalt durch Oligo(dT)-Cellulose (H. Aviv und P. Leder⁴⁰)

Für die Isolierung der Poly(A)-haltigen 9 S RNA wurde Oligo(dT)-Cellulose (Collaborative Research, T₃) benutzt. Eine Pasteurpipette von 2 ml Inhalt wurde mit 0,5 mg Oligo(dT)-Cellulose in Puffer 11 gefüllt. Die Säule wurde anfangs mit H₂O und danach mit Puffer 11 äquilibriert.

250 µg 9 S RNA, gelöst in Puffer 11, wurden auf die Säule gegeben. Die Elution, die bei 4°C durchgeführt wurde, erfolgte zuerst mit den Puffern 11 und 12. Mit H₂O wurde die gebundene, Poly(A)-haltige mRNA freigesetzt. Die Extinktion des Eluats wurde kontinuierlich mit einem Serva Chromatocord Photometer gemessen. Das H₂O-Eluat wurde mit zwei Volumen 96 % Äthanol und 2 % NaCl gefällt. Das Präzipitat wurde in H₂O mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.4 Markierung von 9 S Globin-mRNA mit ^{125}Jod (W. Knöchel⁴²)

50 μg 9 S Globin-mRNA wurden in 100 μl Puffer 13 in Gegenwart von 0.5 mCi ^{125}Jod (trägerfrei) bei 60°C 10 min inkubiert. Nach Abkühlen im Eisbad und Zugabe von 10 μl 0.1 M EDTA und 10 μl 0.1 M Na_2SO_3 wurde die Lösung auf eine Sephadex G 25 Säule (22x0,7 cm) aufgetragen und mit H_2O eluiert. Das Eluat wurde zu 0,5 ml fraktioniert und die Extinktion bei 260 nm gemessen. Fraktionen, die die mRNA enthielten, wurden vereinigt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 0,2 M Tris (pH 8,6), 1/20 Volumen 10 % SDS und 1/10 Volumen 0,1 M EDTA wurde die Probe bei 60°C 20 min inkubiert, im Eisbad abgekühlt und erneut über Sephadex G 25 chromatographiert.

Das Eluat wurde fraktioniert und nach Extinktionsmessung bei 260 nm wurden Aliquots zur Radioaktivitätsbestimmung der Fraktionen entnommen. Fraktionen, die ^{125}J -markierte mRNA enthielten, wurden vereinigt, lyophilisiert und nach Fällung mit 2 Volumen Äthanol, 2 % NaCl in H_2O aufgenommen. Die spezifische Aktivität der ^{125}J -markierten 9 S Globin-mRNA lag bei 2×10^6 dpm/ μg .

3.5 Isolierung von polysomaler RNA

Die Polysomen, deren Isolierung in Kapitel 3.3.1 bereits beschrieben worden war, wurden einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion unterworfen. Die polysomale RNA wurde mit zwei Volumen 96 % Äthanol und 2 % NaCl gefällt, zweimal in 66 % Äthanol, 0,5 % NaCl und einmal in 66 % Äthanol/Äther (2 : 1) gewaschen. Die RNA wurde im Vakuum der Ölpumpe getrocknet, in H_2O gelöst und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.6 Auftrennung der Kern-RNA in Formamid

Zur Größenbestimmung der Kern-RNA, die die Globinsequenzen enthielt, wurden Hybridisierungsreaktionen mit Kern-RNA durchgeführt, die mittels Zentrifugation in Formamid-Saccharose-Gradienten oder Elektrophorese auf exponentiellen Polyacrylamid-Gelen in Formamid aufgetrennt worden war. Das Formamid wurde vor Gebrauch eine Stunde mit dem Ionenaustauscher Amberlite MB 1 (Serva) behandelt und anschließend unter Vakuum destilliert.

3.6.1 Formamid-Saccharose-Gradienten (Y. Suzuki et al.⁴³)

Lineare 4,6 - 22%ige Saccharose-Gradienten in formamidhaltigem Puffer 14 wurden in Polyallomer-Bechern des Spinco SW 41 Rotors hergestellt. Etwa 500 µg RNA wurden lyophilisiert, in 500 µl Puffer 14 aufgenommen und nach einer Inkubation von 30 min bei 35°C aufgetragen. Die Gradienten wurden 40 Stunden bei 39 000 rpm und 25°C zentrifugiert, danach vom Boden her mit einer LKB Schlauchpumpe eluiert und zu je 0,45 ml fraktioniert.

Wegen der hohen Eigenextinktion des Formamids war eine direkte Messung der Extinktion bei 260 nm nicht möglich. Deshalb wurde die Extinktion eines 50 µl Aliquots nach Verdünnung mit 250 µl H₂O bei 260 nm gemessen.

Im Falle einer radioaktiven Markierung der Kern-RNA (siehe Kapitel 3.9) wurde den Fraktionen der Gradienten ein 50 µl Aliquot zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Für Hybridisierungsreaktionen mit unmarkierter cDNA mußte die RNA der einzelnen Fraktionen konzentriert werden. Dazu wurden die Fraktionen mit 20 µg Hefe-tRNA als Träger versetzt, die RNA nach Zugabe von zwei Volumen 96 % Äthanol, 2 % K-acetat zwei Tage bei -20°C gefällt und in 40 µl H₂O aufgenommen.

3.6.2 Elektrophorese auf exponentiellen Polyacrylamid-Gelen in Formamid (M.E. Mirault und K. Scherrer⁴⁴, G. Spohr et al.⁴⁵).

Die Gele wurden in Quarzröhrchen (20 x 0,6 cm) so gegossen, daß die Konzentration des Acrylamids in exponentieller Form von 2,85% - 7,5% anstieg.

Zur Formung dieses exponentiellen Gradienten wurde ein Mischgefäß hergestellt - ähnlich dem Mischgefäß für lineare Saccharose-Gradienten -, bei dem die vordere Kammer für die höher konzentrierte Lösung durch einen Stempel luftdicht und luftleer abgeschlossen werden konnte. Mittels einer Schlauchpumpe (Desaga) wurde die in der vorderen Kammer gemischte Acrylamid-Lösung in die Gelröhrchen gepumpt. Mit diesem System konnten Gele mit beliebigem Konzentrationsanstieg gefertigt werden, der nach folgender Gleichung (1) zu berechnen war:

$$(1) \quad C_v = (C_1 - C_2) \times e^{-V/V_i} + C_2$$

Dabei steht C_v für die aktuelle Mischkonzentration in der vorderen Kammer nach Verdünnung mit dem Volumen V der leichteren Lösung mit der Konzentration C_2 . C_1 steht für die Konzentration der schwereren Lösung, V_i für das zu berechnende Volumen der vorderen Kammer. Bei einem Volumen des zylindrischen Gels $V = L \pi r^2$ (L = Entfernung vom unteren Gelrand, r = Radius des Gels) läßt sich V_i bestimmen, wenn bei $L_{1/2} = 2$ cm gilt:

$$(2) \quad C_v = (C_1 + C_2)/2$$

$$(1) \wedge (2) \Rightarrow (3) \quad (C_1 + C_2)/2 = (C_1 - C_2) \times e^{-V/V_i} + C_2$$

$$\Leftrightarrow (C_1 - C_2)/2 = (C_1 - C_2) \times e^{-V/V_i}$$

$$\Leftrightarrow -\ln 0,5 = V/V_i$$

$$\Leftrightarrow 0,69 = V/V_i$$

$$(4) \quad V = L_{1/2} \pi r^2$$

$$\Rightarrow V = 2 \text{ cm} \cdot \pi \cdot 0,09 \text{ cm}^2$$

$$\Leftrightarrow V = 0,56 \text{ cm}^3$$

$$(3) \wedge (4) \Rightarrow (5) \quad V_i = 0,56 \text{ cm}^3 / 0,69$$

$$\Leftrightarrow V_i = \underline{0,82 \text{ ml}}$$

Das Volumen des exponentiellen Gels betrug bei 13 cm Länge 3,67 ml. Somit ergab sich für das Volumen der leichteren Lösung der Differenzbetrag von 2,85 ml.

Die Gele wurden aus Stammlösungen mit 30 % Acrylamid in Formamid (A und B) hergestellt, wobei A 2 % und B 4,5 % Bisacrylamid enthielt. Die Gele wurden auf ein Kissen von 3 cm 10 % Polyacrylamid-Gel gegossen.

Zusammensetzung der Gele:

		10 % Gel	7,5 % Gel	2,85 % Gel
Puffer 15	(ml)	1	1	4
Glycerin	(ml)	2	2	2
Acrylamid: A	(ml)	3,33	2,5	-
B	(ml)	-	-	3,8
Formamid	(ml)	3,66	4,48	30,2
TMED	(μ l)	10	10	80
50 % Ammonperoxidisulfat	(μ l)	10	10	80

Die Gele wurden zum Polymerisieren mit Formamid überschichtet, das die gleichen Konzentrationen an Puffer 15 und Katalysatoren enthielt wie das 2,85%ige Gel. Die Polymerisation erfolgte 24 Stunden.

Zur Elektrophorese wurden 10-100 μ g RNA in 20 μ l Puffer 16 gelöst und mit 200 μ l Formamid verdünnt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurden 100 μ l Glycerin hinzugegeben und die Probe aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 20 Stunden bei 10 V/cm und Raumtemperatur durchgeführt. Die Elektrophoresekamern enthielten Formamid oder H₂O mit 1/10 Volumen Puffer 15. Wie Kontrollversuche zeigten, war die Auftrennung unabhängig von der Wahl des Lösungsmittels (Formamid oder H₂O)

in den Kammern. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele bei 260 nm im Gelscanner 2520 des Gilford Spektralphotometers 250 gescannt.

Danach wurden die Gele in den Quarzröhrchen mit festem CO_2 eingefroren, hinausgestoßen und zu Scheiben von 0,5 cm geschnitten.

Um die aufgetrennte RNA zu eluieren, wurde jede Scheibe in 1,7 ml Puffer 17 homogenisiert und über Nacht bei 4°C aufbewahrt (A. Berns et al.⁴⁶). Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand abgehoben und die RNA-Extraktion aus dem Sediment wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und mit gleichem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Die RNA wurde zur quantitativen Fällung mit 100 μg Hefe-tRNA versetzt, nach Zugabe von zwei Volumen 96 % Äthanol, 2 % NaCl zwei Tage bei -20°C gefällt und anschließend in 100 μl H_2O aufgenommen.

3.7 Synthese von ^3H -markierter cDNA

Zur Synthese von ^3H -dCTP markierter cDNA, die einer mRNA komplementär ist, wurde 9 S Globin-mRNA bzw. "Leberprotein-mRNA" benutzt (siehe Kapitel 3.14.3), die durch Bindung an Oligo(dT)-Cellulose isoliert worden war. Die Synthese der markierten cDNA wurde in einem Ansatz von 125 μl durchgeführt. Der Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Salzlösung 1:	25 μl
Dithiotreitol (Endkonzentration: 10 mM)	
KCl (Endkonzentration: 50 mM)	
MgCl_2 (Endkonzentration: 6 mM)	
RNAase Inhibitor (Endkonzentration 1 mg/ml, Searle)	

Lösung 2:	25 μl
dATP	} (Endkonzentration: jeweils 0,5 mM)
dGTP	
dTTP	

Actinomycin D (Endkonzentration: 50 µg/ml)	
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (Endkonzentration: 100 µg/ml)	
250 µCi ³ H-dCTP in H ₂ O (24,1 mCi/µMol; NEN)	62 µl
mRNA (1 mg/ml)	5 µl
Reverse Transcriptase (150 U/80 µl; Boehringer)	8
	125 µl

Da ³H-dCTP in einem Wasser/Alkohol Gemisch gelöst war, wurde es vor Gebrauch mit Stickstoff überblasen, um den Alkohol auszutreiben, anschließend lyophilisiert und in 62 µl H₂O aufgenommen.

Die Synthese der cDNA wurde nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C durch Zugabe von 20 µl 10 % SDS, 10 µl 0,3 M EDTA, 65 µl Escherichia coli DNA (1 mg/ml) und 110 µl 1 N NaOH (zur Hydrolyse der RNA) beendet. Der Ansatz wurde 20 Stunden bei 37°C weiterinkubiert und danach mit 110 µl 1 N HCl neutralisiert.

Nach Zugabe von 50 µl 0,5 M Na-phosphat (pH 6,8) wurde das Material über eine mit 0,15 M NaCl äquilibrierte Sephadex G 75 Säule (30 x 0,5 cm) aufgetrennt. Die Fraktionen, die hochmolekulare cDNA enthielten, wurden nach Entnahme eines Aliquots zur Kontrolle der Radioaktivitätsverteilung vereinigt und mit zwei Volumen 96 % Äthanol und 2 % Na-acetat bei -20°C gefällt. Die cDNA wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet, in 500 µl H₂O gelöst und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.8 Hybridisierung von RNA mit ³H-Poly(U) und ³H-markierter cDNA

3.8.1 Hybridisierungsreaktion mit ³H-Poly(U) (A. Cann et al.⁴⁷)

Zur Untersuchung des Poly(A)-Gehalts der in Formamid-Saccharose-Gradienten aufgetrennten Kern-RNA wurden 100 µl jeder Fraktion auf die Konzentration von Puffer 18 gebracht. Nach Zugabe von 0,1 µCi ³H-Poly(U) (500 Ci/Mol P; Amersham Buchler) und Erhitzen der Proben auf 80°C für 3 min wurde die Hybridisierungsreaktion 30 min bei 37°C

ausgeführt. Zum Abbau der nichthybridisierten, einzelsträngigen Nukleinsäuren wurde jede Fraktion mit 450 μ l Puffer 19, der 5 μ g/ml RNAse A und 20 μ l/ml DNAase I enthielt, versetzt und bei 37°C 2 Stunden inkubiert. Kontrollversuche wurden mit Puffer 19 ohne Nukleasen entsprechend durchgeführt. Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden alle Proben nach Zugabe von 300 μ l Globulin (1 mg/ml in 0,9 % NaCl) mit 450 μ l 30 % Trichloressigsäure und 0,01 % Uridin gefällt und noch dreimal mit 5 % TCA gewaschen.

3.8.2 Hybridisierungsreaktion mit 3 H-markierter cDNA

Die Hybridisierungsreaktion von 3 H-markierter cDNA mit RNA wurde in einem Endvolumen von 15 μ l durchgeführt. In den Ansätzen wurden 600 cpm 3 H-markierter cDNA (in Fraktionen, die Globinsequenzen enthielten bis zu 6 000 cpm) mit 4,5 μ l einer Gelfraktion oder 1 μ l einer Gradientenfraktion und 10 μ l Puffer 20 aufgefüllt, so daß stets eine Formamidkonzentration von 50 % erreicht wurde (P.R.Harrison et al.⁴⁸).

Zur Aufstellung von c_{ro} -Kurven wurden im Überschuß vorgegebene Mengen RNA mit 1 000 cpm/Einfachansatz hybridisiert.

Nach Erhitzen der Proben auf 80°C für 3 min wurden die Ansätze bei 43°C inkubiert. Während Hybridisierungsreaktionen mit fraktionierter RNA 24 Stunden andauerten, wurde die Zeit bei Reaktionen zur Ermittlung der c_{ro} -Werte variiert.

Die Hybridisierungen wurden mit 750 μ l Puffer 21 pro Ansatz und 10 U/ml Nuklease S_1 aus *Aspergillus oryzae* (Sigma) gestoppt. Die Reaktionsröhrchen (3,5 x 0,3 cm) wurden 2 Stunden bei 37°C weiterinkubiert. Nach Zugabe von 300 μ l Globulin (1 mg/ml in 0,9 % NaCl) wurden die Proben mit 500 μ l 30 % Trichloressigsäure gefällt und zur Radioaktivitätsmessung vorbereitet.

Weniger als 5 % der 3 H-markierten cDNA wurde in Kontrollen bei Abwesenheit von RNA nicht abgebaut. Der Betrag dieser Impulse wurde je-

weils von den einzelnen Werten abgezogen.

3.9 Isolierung von ^3H -markierter Kern-RNA

Unreife rote Blutzellen von Hühnern wurden ohne Heparininjektion isoliert und gewaschen wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben. 10 ml der roten Blutzellen wurden in 2 Volumen Serum mit 100 U Penicillin/ml suspendiert. Das Serum war aus dem Blut unbehandelter Hühner nach ca. einstündiger Gerinnung bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 3 000 rpm in der Christ Kühllzentrifuge gewonnen worden.

Die Zellen wurden entweder

- a) 15 min mit 2,5 mCi ^3H -Uridin (48 Ci/mMol, Amersham TRK 423) oder
- b) 25 min mit 5 mCi ^3H -Adenosin (24 Ci/mMol, Amersham TRK 410) (jeweils in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen) bei 37°C inkubiert.

Die Aufnahme der radioaktiv markierten Nukleoside wurde durch Zugabe von 10 Volumen eiskaltem Puffer 1 gestoppt. Die Isolierung der RNA aus den Kernen dieser Zellen, die noch dreimal gewaschen wurden, erfolgte ebenso wie bei der unmarkierten Kern-RNA. Die spezifische Radioaktivität der pulsmarkierten Kern-RNA betrug

- etwa a) 3 000 cpm/ μg nach der ^3H -Uridin- und
b) 2 000 cpm/ μg nach der ^3H -Adenosinmarkierung.

3.10 Synthese von unmarkierter Globin-cDNA

Die Synthese einer unmarkierten cDNA, die komplementär zur Poly(A)-haltigen 9 S Globin-mRNA war (Isolierung siehe Kapitel 3.3.2), erfolgte nach einer von J. Ross⁴⁹ angegebenen Methode mit einigen Veränderungen. Die Synthese wurde in einem Ansatz von 2,4 ml durchgeführt. Der Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Salzlösung 1: 0,6 ml

Tris pH 8,0 (Endkonzentration: 50 mM)

NaCl (Endkonzentration: 50 mM)

KCl (Endkonzentration: 80 mM)

Mg-acetat (Endkonzentration: 6 mM)

Lösung 2: 0,6 ml

dATP	}	(Endkonzentration: jeweils 0,2 mM)
dCTP		
dGTP		
dTTP		

Dithiotreitol (Endkonzentration: 2 mM)

Actinomycin D (Endkonzentration: 50 µg/ml)

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Endkonzentration: 20 µg/ml)

0,1 µCi ³ H-dCTP in H ₂ O (22,9 Ci/mMol, NEN)	0,01 ml
---	---------

9 S mRNA (1 mg/ml)	0,04 ml
--------------------	---------

Reverse Transcriptase (150 U/80 µl, Boehringer)	0,08 ml
---	---------

H ₂ O	<u>1,07 ml</u>
	2,4 ml

Die sehr geringe Menge ³H-dCTP im Ansatz der "unmarkierten" cDNA diente der Kontrolle zum Ablauf der Synthese.

Die Synthese wurde nach 90 min Inkubation durch Zugabe von 0,3 ml 10 % SDS, 0,15 ml 0,3 M EDTA, 0,2 ml 2 M NaCl, 0,3 ml Escherichia coli DNA (1 mg/ml), 0,1 ml Hefe-tRNA (1 mg/ml) und 1,5 ml 1 N NaOH (zur Hydrolyse der RNA) gestoppt. Der Ansatz wurde 24 Stunden bei 37°C weiterinkubiert, danach mit 1,5 ml 1 N HCl neutralisiert und mit gleichem Volumen 80 % Phenol extrahiert. Nach der Phasentrennung wurde die Phenol-Phase mit halbem Volumen 0,2 M NaCl und 1 % SDS nachextra-
hiert; beide wässrigen Phasen wurden vereinigt. Die cDNA wurde mit zwei Volumen 96 % Äthanol und 2 % NaCl gefällt, im Ölpumpenvakuum getrocknet und etwa 90 min bei 4°C in 1 ml H₂O gelöst.

3. 11 Hybridisierungsreaktion mit der unmarkierten Globin-cDNA

Die Hybridisierungsreaktion von unmarkierter Globin-cDNA mit fraktionierter, ^3H -markierter Kern-RNA wurde in einem Endvolumen von 90 μl (oder einem Vielfachen davon) durchgeführt. 10 μl der jeweils konzentrierten RNA-Fractionen der Formamid-Saccharose-Gradienten wurden mit 400 ng cDNA (entsprechend 20 μl) und 60 μl Puffer 20 (Endkonzentration für Formamid: 50 %) nach Erhitzen auf 80°C für 3 min bei 43°C zur Hybridisierung inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1 ml pro Fraktion Puffer 22 gestoppt, der 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNAase A (Calbiochem) und 125 U/ml RNAase T_1 (Sigma) enthielt. Die Ansätze wurden 90 min bei 37°C weiterinkubiert. In Kontrollansätzen wurde H_2O anstelle von cDNA eingesetzt.

Bei ^3H -Adenosin markierter Kern-RNA wurde eine weitere Kontrolle zur Untersuchung des Abbaus der Poly(A)-Sequenzen ausgeführt. Nach dem Enzymabbau mit RNAase A und RNAase T_1 wurden die Fractionen mit 1 ml 0,04 M NH_4^+ -acetat (pH 4,5) und 10 U/ml RNAase T_2 versetzt und nochmals 90 min bei 37°C inkubiert.

Nach Zugabe von 400 μl Globulin (1 mg/ml in 0,9 % NaCl) wurden die Proben mit 0,6 ml 30 % Trichloressigsäure gefällt und zur Radioaktivitätsmessung vorbereitet. Der geringe Betrag der Impulse, der durch die "unmarkierte" cDNA eingebracht wurde (40 cpm/Ansatz), wurde von den einzelnen Werten abgezogen.

3. 12 Isolierung von Poly(A)-Sequenzen aus RNA-Molekülen mit Globinsequenzen von ^3H -Adenosin markierter Kern-RNA

3. 12. 1 Abtrennung der Hybride von einzelsträngiger, degradierter RNA durch Hydroxylapatit

^3H -Adenosin markierte Kern-RNA aus fünf parallel gelaufenen Formamid-Saccharose-Gradienten, die bei 9 S und bei 15 S sedimentierte, wurde getrennt gepoolt und durch Zugabe von 2 Volumen 96 % Äthanol und 2 %

NaCl gefällt. Die RNA beider Pools wurde mit je 15 μg unmarkierter Globin-cDNA in einem Endvolumen von 900 μl wie unter 3.11 beschrieben hybridisiert. Die Hybridisierung wurde mit 9 ml Puffer 22 gestoppt, der RNAase A und RNAase T₁ enthielt. Nach einer Inkubation von 90 min bei 37°C wurden die Proben 0,12 M an Na-phosphat (pH 6,8) (äquimolare Mischung aus Na₂HPO₄ und NaH₂PO₄) gemacht und das Volumen auf 15 ml erweitert.

Zur Auftrennung der Hybride wurden die Ansätze auf eine auf 60°C temperierte Hydroxylapatit- (DNA grade, Bio -Gel HTP, Bio-Rad) Säule (3 x 1 cm) aufgetragen (R.J.Britten et al.⁵⁰). Nach ausführlichem Waschen der Säule mit 0,12 M Na-phosphat (pH 6,8) wurden die an die Säule gebundenen Hybride mit 0,5 M Na-phosphat (pH 6,8) eluiert. Die Fraktionen, die die Hybride enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert. Das Material wurde in 1,5 ml H₂O aufgenommen, durch Chromatographie an einer Sephadex G 25 Säule (25 x 0,9 cm) in 10 mM NaCl von Phosphaten gereinigt, wieder gepoolt und lyophilisiert.

Zur Kontrolle, ob bei dieser Methode tatsächlich eine Trennung der Hybride von einzelsträngiger, enzymatisch degradiert RNA erreicht wird, wurden die Gradientenfraktionen zwischen 9 S und 15 S gepoolt und unter Auslassen der cDNA-Hybridisierung wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

3.12.2 Analyse der Poly(A)-Sequenzen

Das lyophilisierte Material des 9 S und 15 S Pools wurde in Puffer 23 aufgenommen und zum Schmelzen der Hybride auf 95°C für 3 min erhitzt. Die Proben wurden sehr schnell abgekühlt und nach Entnahme eines 0,1 ml Aliquots (Kontrolle I) mit 60 μl Enzymlösung (10 μg DNAase I, 5 μg RNAase A und 125 U RNAase T₁) gelöst in 10 mM NaCl und 10 mM Tris (pH 7,5) versetzt. Die Proben wurden 90 min bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot von 0,1 ml (Kontrolle II) wurde wieder ent-

nommen und mit 100 μl 0,04 NH_4^+ -acetat (pH 4,5) und 20 U RNAase T_2 90 min bei 37°C weiterinkubiert.

Beide Kontrollen und 200 μl der verbliebenen Proben wurden auf die Konzentration von 10 mM EDTA, 80 mM NaCl und 10 mM Tris (pH 7,5) bei einem Endvolumen von 400 μl gebracht. Nach Zugabe von 40 μg Hefe-tRNA wurden die verschiedenen Proben im 15-30 % Saccharose-Gradienten in Puffer 10 im Spinco SW 65 Rotor bei 60 000 rpm und 0°C 15 Stunden zentrifugiert. Die Fraktionen wurden nach Fällung mit 30 % Trichloressigsäure zur Radioaktivitätsbestimmung vorbereitet. Als Marker-Substanzen wurden in einem Parallelgradienten neben 9 S RNA 4 S tRNA und 5 S rRNA zentrifugiert, die freundlicherweise von Herrn Dr. B. Wittig zur Verfügung gestellt wurden.

3.13 Bestimmung von c_{ro} -t-Werten

Die c_{ro} -Kurve stellt ein Charakteristikum für das Vermögen einer RNA dar, mit einer bestimmten DNA-Sequenz zu hybridisieren. Die Werte werden gebildet aus dem Produkt der Mole Phosphat der RNA im Ansatz (Konzentration: Mol/l) und der Zeit t (sec) der Hybridisierung. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 310 für Nukleosidmonophosphat und einem Molekulargewicht von 95 für Phosphat ergibt sich ein Phosphatanteil von 30,6 % in der RNA.

1 μg RNA enthält folglich 0,306 μg Phosphat, entsprechend:

$$\begin{aligned} 0,306 \mu\text{g} : 95 \mu\text{g}/\text{Mol} &= 0,00323 \mu\text{Mol} \\ &= 3,23 \times 10^{-9} \text{ Mol} \end{aligned}$$

1 μg RNA enthält also $3,23 \times 10^{-9}$ Mol Phosphat.

Wenn 50 % der vorgegebenen DNA in Hybridform vorlagen, war der $c_{\text{ro}}^{t_{1/2}}$ -Wert erreicht.

3.14 Untersuchung auf "Leberprotein" codierende Sequenzen in den RNA-Fractionen aus unreifen roten Blutzellen

3.14.1 Präparation des Leber-Zellextraktes

Als Ausgangsmaterial dienten unbehandelte ca. 1 Jahr alte Hühner der Rasse "Weißes Leghorn". Die Leber wurde durch Öffnen des Thorax unter Äthernarkose des Tieres freipräpariert und in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gespült. Alle folgenden Arbeiten wurden im Eis ausgeführt. Die Leber (etwa 35 g) wurde mit einer sterilen Schere in kleine Stücke geschnitten, in 2,5-fachem Volumen (v/w) Puffer 24 aufgenommen und im automatischen Teflon-Glashomogenisator (Braun-Melsungen) zum Aufschluß der Zellen mit 6 Strokes bei 750 rpm homogenisiert (H. Bloemendal et al.⁵¹).

3.14.2 Isolierung der polysomalen Poly(A)-haltigen "Leberprotein-mRNA"

Um grobe Bestandteile abzutrennen, wurde das Leberhomogenat durch zwei Lagen Gaze gegeben und 15 min im Spinco Al 30 Rotor bei 12 000 rpm und 0°C zentrifugiert. Der postmitochondriale Überstand ohne Lipidschicht wurde 0,5%ig an Triton X 100 gemacht, mit 2ml 0,8 M Saccharose in Puffer 9 unterschichtet und 2 Stunden im Spinco Ti 60 Rotor bei 50 000 rpm und 0°C zentrifugiert.

Die Polysomen wurden in Puffer 25 suspendiert und auf eine Konzentration von 20 E₂₆₀ Einheiten gebracht. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (siehe Kapitel 3.1.4). Die polysomale Leber-RNA wurde durch Zugabe von 2 Volumen 96 % Äthanol und 2 % NaCl gefällt, zweimal mit 66 % Äthanol, 0,5 % NaCl und einmal mit 66 % Äthanol/Äther (2 : 1) gewaschen, im Ölpumpenvakuum getrocknet und schließlich in H₂O aufgenommen. Aus dieser polysomalen RNA wurde durch dreimalige Oligo(dT)-Cellulose Chromatographie Poly(A)-haltige RNA abgetrennt (siehe Kapitel 3.3.2).

3.14.3 Synthese und Hybridisierungsreaktion von ^3H -markierter
"Leberprotein-cDNA "

Die Synthese der ^3H -markierten " Leberprotein-cDNA", die der poly-somalen, Poly(A)-haltigen " Leberprotein-mRNA" komplementär ist, wurde in einem Volumen von 125 μl wie in Kapitel 3.7 bereits beschrieben durchgeführt. Die Hybridisierungsreaktionen mit der " Leberprotein-cDNA" wurden wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben durchgeführt.

3.15 Translation der RNA-Fractionen aus unreifen roten Hühner-
blutzellen im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumor-
zellen (M. Mathews und A. Korner⁵², W. Knöchel⁵³)

3.15.1 Präparation des zellfreien Systems

Ehrlich Ascites Zellen aus Mäusen - freundlicherweise von Prof. Dr. E. Liss, Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin, zur Verfügung gestellt - wurden nach intraperitonealer Transplantation von 0,2 - 0,4 ml Ascitesflüssigkeit pro Empfängertier gezüchtet. Die Tiere wurden nach 9 - 10 Tagen durch cervicale Dislocation getötet und der Ascites entnommen.

Die Ascites Zellen wurden bei 1 500 g sedimentiert und mehrmals in Puffer 26 gewaschen. Die Zellen wurden danach mit 2 Volumen Puffer 27 unter schwachem Rühren im Eisbad 10 min lysiert. Um eine vollständige Zerstörung zu erreichen, wurden die Zellen mittels eines fest eingepaßten Dounce Homogenisators mit 30 Strokes nachhomogenisiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Puffer 28 (bezogen auf das Volumen Puffer 27) wurde das Lysat 15 min im Spinco Al 30 Rotor bei 13 000 rpm und 0°C zentrifugiert.

Der postmitochondriale Überstand wurde ohne Lipidschicht abgehoben und nach Zugabe von 1/100 Volumen einer 5 mM Lösung von 20 Aminosäuren und 1/20 Volumen einer Lösung von 20 mM ATP, 2 mM GTP, 40 mg Kreatinphosphat/ml, 4 mg Kreatinkinase/ml bei 37°C für 30 min inkubiert, um die endogene Proteinbiosynthese herabzusetzen.

Der Ansatz wurde über eine mit Puffer 29äquilibrierte Sephadex G 25 Säule (18 x 2 cm) aufgetrennt. Das Eluat wurde zu je 0,5 ml fraktioniert. Nach Entnahme eines Aliquots zur Extinktionsmessung wurde das hochmolekulare Material in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.15.2 Präparation einer ribosomalen Waschfraktion (S.M. Heywood⁵⁴⁾)

Etwa 100 mg Polysomen aus unreifen roten Zellen von Hühnern wurden in 2 ml Puffer 30 suspendiert und 1 Stunde bei 0°C unter Vermeidung von Schaumbildung vorsichtig gerührt. Die Lösung wurde im Spinco Ti 50 Rotor 2 Stunden bei 48 000 rpm, 0°C zentrifugiert und der Überstand bei 4°C über eine mit Puffer 31 äquilibrierte Sephadex G 25 Säule (18 x 2 cm) aufgetrennt. Das Eluat wurde zu je 8 Tropfen fraktioniert. Das hochmolekulare Material wurde nach Entnahme eines Aliquots zur Extinktionsmessung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.15.3 Translation der RNA

Die Translation der RNA wurde in 50 µl Ansätzen oder einem Vielfachen davon durchgeführt. Die 50 µl Ansätze waren folgendermaßen zusammengesetzt:

0,4 E ₂₆₀ Einheiten des Ascites Extraktes	8,0 µl
18 Aminosäuren (Endkonzentration: 50 µM)	0,5 µl
Cystein (Endkonzentration: 50 µM)	0,5 µl
³ H-Leucin (1,0 µCi) (53 Ci/mMol, Amersham)	1,0 µl
EGS (energieregenerierendes System)	2,5 µl

ATP (Endkonzentration: 1 mM)	
GTP (Endkonzentration: 0,1 mM)	
Kreatinphosphat (Endkonzentration: 5 mM)	
10 µg Kreatinkinase	
0,06 E ₂₈₀ Einheiten der ribosomalen Waschfraktion	8,5 µl
20 x M Puffer	2,5 µl
KCl (Endkonzentration: 95 mM)	
MgCl ₂ (Endkonzentration: 2,5 mM)	
Tris-HCl, pH 7,5 (Endkonzentration: 20 mM)	
2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration: 7 mM)	
RNA und/oder H ₂ O	<u>26,5 µl</u>
	50,0 µl

Die Ansätze wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Messung des ³H-Leucin Einbaus in Proteine wurde die Proteinbiosynthese durch Zugabe von 0,2 ml 0,1 N KOH Lösung gestoppt, die 10 mM unmarkiertes Leucin enthält. Nach einer weiteren Inkubation von 20 min bei 37°C wurde das Material für die Radioaktivitätsbestimmung in Gegenwart von 0,3 ml Globulin (1 mg/ml in 0,9 % NaCl) als Träger mit 0,2 ml Trichloressigsäure gefällt.

3.16 Isolierung von Globinketten als Referenzsubstanz (R.E. Lockard und J.B. Lingrel⁵⁵)

Vom 100 000 g Überstand eines Lysats aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern wurden 2,5 ml bei -15°C (Mischung aus Eis und Viehsalz) tropfenweise zu einer Mischung aus 3,5 g Oxalsäure und 100 ml Aceton (0,035 M an HCl) gegeben. Das Präzipitat wurde sofort 2 min bei 4 000 g und -15°C abzentrifugiert und noch zweimal mit reinem Aceton gewaschen. Nach sorgfältiger Trocknung am Ölpumpenvakuum wurden die Globinketten bei -20°C aufbewahrt. ¹⁴C-markierte Globinketten wurden nach einer Vorschrift von Shapira et al.⁵⁶ hergestellt.

Unreife rote Hühnerblutzellen wurden mit ^{14}C -Leucin markiert und die Globinketten daraus wie oben beschrieben isoliert.

3.17 Produktanalyse der zellfreien Proteinbiosynthese

3.17.1 Gelfiltration über Sephadex G 100

Zur Produktanalyse wurde ein fünffacher Ansatz des zellfreien Systems inkubiert und der Proteineinbau durch Zugabe von 0,1 ml 0,3 M EDTA gestoppt. Zuvor wurde ein Aliquot zur Radioaktivitätsbestimmung abgenommen (siehe Kapitel 3.15.3). Das restliche Material wurde mit 30 mg Globinketten als Referenzsubstanz versetzt und gegen 1 l 7 M Harnstoff (pH 2,5 mit 10 N HCl eingestellt) dialysiert.

Der Harnstoff wurde zweimal gewechselt. Die Proben wurden danach über eine Sephadex G 100 Säule (100 x 1,6 cm), die ebenfalls mit 7 M Harnstoff äquilibriert war, chromatographiert. Das Eluat wurde zu je 2,5 ml fraktioniert und die Extinktion bei 280 nm mit einem Gilford-Spektralphotometer 250 gemessen. Die Fraktionen, die die Globinketten enthielten, wurden vereinigt.

3.17.2 Chromatographie an Carboxymethylcellulose

Die vereinigten, die Globinketten enthaltenden Fraktionen der Sephadex G 100 Säule wurden 12 Stunden gegen Puffer 32 dialysiert und auf Carboxymethylcellulose Säulen (CM 52, Whatman) (15 x 0,6 cm) aufgetragen. Die Auftrennung in die einzelnen Globinketten erfolgte durch einen linearen Gradienten (50 ml Puffer 32 und 50 ml Puffer 33). Das Eluat wurde zu Fraktionen von 1,5 ml gesammelt und die Extinktion wieder bei 280 nm gemessen. Aliquots von 0,5 ml wurden zur Bestimmung der Radioaktivität in wässriger Lösung abgenommen.

3.17.3 Analyse der tryptischen Peptide (J. Hendrick et al.⁵⁷⁾

3.17.3.1 Perameisensäure Oxydation

Die Fraktionen der CM-Säulen, die die α -Globinketten enthielten, wurden vereinigt. Die Proben wurden zwei Tage gegen H_2O (viermal gewechselt) bei $4^{\circ}C$ dialysiert und anschließend lyophilisiert. Eine Perameisensäure Lösung aus 9,5 ml 99% Ameisensäure und 0,5 ml 33 % H_2O_2 wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die lyophilisierten Proben wurden in je 1 ml einer Ameisensäure-Methanol-Mischung (4 Volumen Ameisensäure, 1 Volumen Methanol) gelöst und bei $-10^{\circ}C$ (Mischung aus Eis und Viehsalz) abgekühlt. Die Proben wurden mit 1/3 Volumen der Perameisensäure Lösung versetzt und 2,5 Stunden bei $-10^{\circ}C$ inkubiert. Nach Zugabe von 20 Volumen H_2O wurden die Proben zweimal lyophilisiert.

3.17.3.2 Tryptische Verdauung

Eine 1%ige Trypsinlösung wurde in 0,1 N HCl 24 Stunden inkubiert und danach mit H_2O im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Die lyophilisierten Proben wurden jeweils in 500 μl H_2O gelöst und mit 50 μl 1%iger NH_4HCO_3 (pH 8,5), 10 μl 1/4 konz. Ammoniak und 20 μl der 0,5%igen Trypsinlösung versetzt. Nach Zugabe von NH_4HCO_3 erfolgte eine Trübung, die aber während der Inkubation von 4 Stunden wieder verschwand. Die Proben wurden danach mit 10 Volumen H_2O versetzt und wieder zweimal lyophilisiert.

3.17.3.3 Peptidanalyse

Die tryptischen Peptide wurden in je 300 μl Puffer 34 aufgenommen und an einer Aminex A₅ Ionenaustauscher Säule (40 x 0,5 cm) aufgetrennt. Zu Beginn des Laufes wurde ein Druck von 9,5 atü bei $50^{\circ}C$ angelegt. Die Proben wurden mit einem linearen Gradienten (80 ml Puffer 34 als Startpuffer und 80 ml Puffer 35 als Endpuffer) mittels einer Hochdruck-

pumpe (Milton Roy) eluiert und zu 7 ml fraktioniert. Die Laufzeit der Säule betrug etwa 22 Stunden, der Enddruck lag bei 13 atü. Aliquots der Fraktionen wurden zur Radioaktivitätsbestimmung in wässriger Lösung entnommen.

3.18 Messung der Radioaktivität

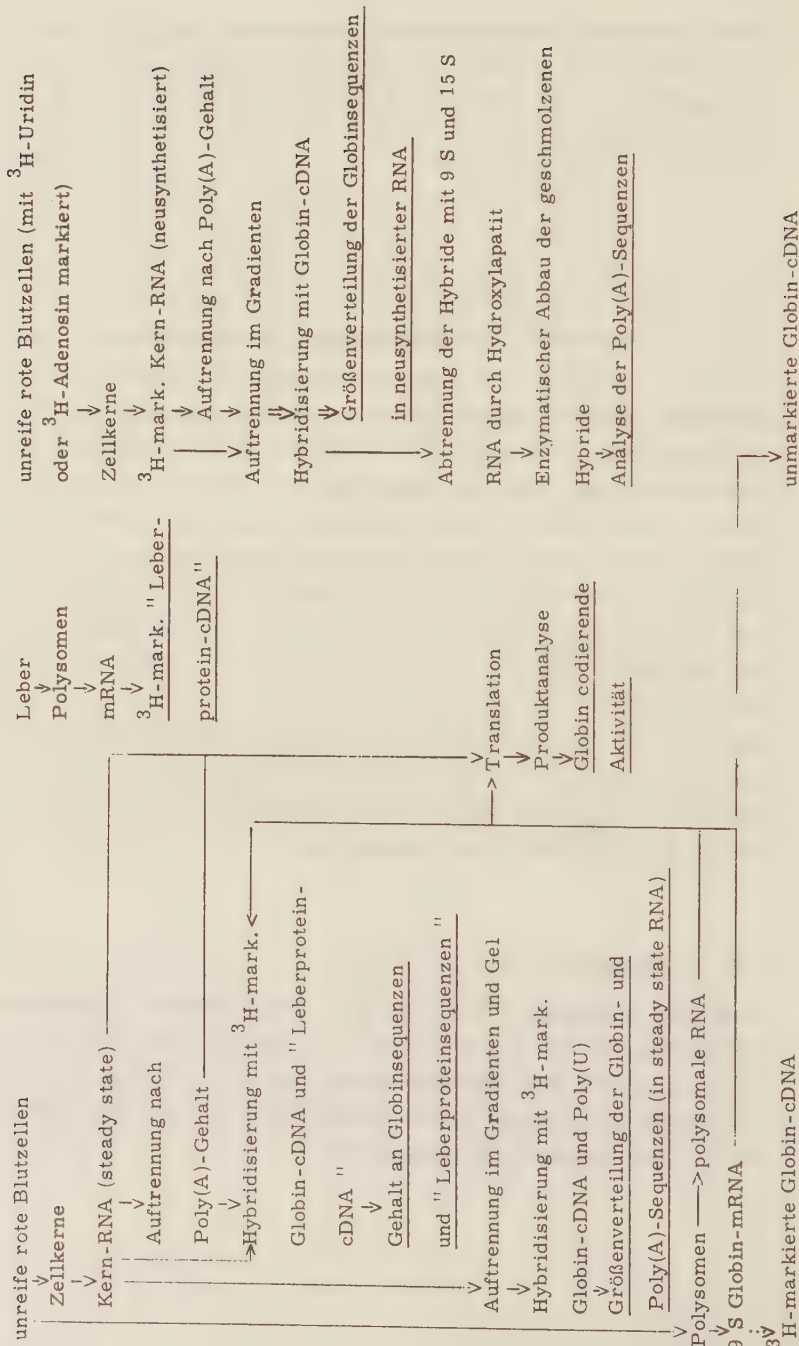
3.18.1 Messung von Trichloressigsäure fällbarem Material

Proben von 50 µl wurden zur quantitativen Fällung mit 0,3 ml einer Rinderglobulinlösung (1 mg/ml in 0,9 % NaCl) als Träger versetzt und durchmischt. Nach Zugabe von 0,2 ml 30 % Trichloressigsäure wurden die Proben erneut durchmischt und 10 min bei 0°C gekühlt, wodurch hochmolekulares, Trichloressigsäure (TCA) fällbares Material ausfiel. Größere Proben wurden mit entsprechenden Mengen versetzt. Die Proben wurden 10 min bei 0°C und 5 000 rpm in der Christ Kühnzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment noch zweimal mit 5 % Trichloressigsäure gewaschen. Nach sorgfältigem Auswischen der Probenröhrchen mit Filterpapier wurde das Sediment in 0,5 ml Hyamin (1 M in Methanol) aufgenommen und zur vollständigen Auflösung 15 min bei 57°C inkubiert. Die Messung der Radioaktivitäten erfolgte in 10 ml Omnifluor/Toluol Cocktail (4 g/l) im Beckman LS 230 Flüssigkeits-Szintillationszähler.

3.18.2 Messung in wässrigen Lösungen

Die Proben wurden zur Messung in 15 ml Cocktail folgender Zusammensetzung aufgenommen: 7,5 g PPO und 150 mg Dimethyl-POPOP in 670 ml Toluol, 330 ml Äthylglycolmonomethyläther und 35 ml Hyamin (1 M in Methanol). Die Messung der Radioaktivitäten erfolgte wieder im Beckman LS 230 Flüssigkeits-Szintillationszähler.

Übersicht über den methodischen Ablauf



3.19 Lösungen und Puffer

- 1 0,14 M NaCl, 5 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 10 mM Tris (pH 7,4)
- 2 20 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 10 mM Tris (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 6 mM an 2-Mercaptoäthanol gemacht.
- 3 0,8 M KCl, 10 mM MgCl_2 , 0,1 M Tris (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 60 mM an 2-Mercaptoäthanol gemacht.
- 4 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA (pH 5,1)
- 5 10 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM Tris (pH 8,0)
- 6 0,7 M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris (pH 7,5), 25 % Formamid
- 7 0,5 M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris (pH 7,5), 0,2 % Lauroyl-Sarcosin, 50 % Formamid
- 8 10 mM EDTA, 0,2 % Lauroyl-Sarcosin, 10 mM Kaliumphosphat (pH 7,5), 90 % Formamid
- 9 0,1 M KCl, 10 mM MgCl_2 , 20 mM Tris (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 6 mM an 2-Mercaptoäthanol gemacht
- 10 80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7,5)
- 11 0,5 M KCl, 10 mM Tris (pH 7,5)
- 12 0,1 M KCl, 10 mM Tris (pH 7,5)
- 13 0,1 M Na-acetat, 40 mM Essigsäure, 7,5 mM TiCl_3 , $6,25 \times 10^{-2}$ mM KJ (pH 5,0)
- 14 3 mM EDTA, 3 mM Tris (pH 7,4), 70 % Formamid (w/w)
- 15 0,5 M Triäthanolamin, 0,2 M Citronensäure, 20 mM EDTA (pH 7,0) in Formamid
- 16 10 mM NaCl, 10 mM Triäthanolamin (pH 7,4)
- 17 0,5 M LiCl, 0,5 % SDS
- 18 0,45 M NaCl, 45 mM Natriumcitrat, 3 mM Tris (pH 7,0), 50 % Formamid
- 19 10 mM MgCl_2 , 10 mM Tris (pH 7,0)
- 20 0,75 M NaCl, 0,75 mM EDTA, 37,5 mM Hepes (pH 6,8), 75 % Formamid
- 21 0,15 M NaCl, 1,5 mM ZnSO_4 , 30 mM Natriumacetat (pH 4,5)

- 22 0,2 M NaCl, 4 mM EDTA, 20 mM Tris (pH 7,2)
- 23 0,1 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris (pH 7,2)
- 24 0,35 M Saccharose, 25 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris
(pH 7,6)
- 25 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 % SDS, 0,1 M Tris (pH 9,0)
- 26 0,146 M NaCl, 10 mM Tris (pH 7,8)
- 27 15 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 6 mM an 2-Mercaptoäthanol gemacht.
- 28 0,8 M KCl, 40 mM $MgCl_2$, 0,2 M Tris (pH 7,5)
- 29 80 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris (pH 7,5)
- 30 0,5 M KCl, 10 mM Tris (pH 7,5)
- 31 0,1 M KCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris (pH 7,5)
- 32 6 M Harnstoff, 0,127 M Ameisensäure (pH 3,54) eingestellt mit Triäthylamin
- 33 6 M Harnstoff, 0,508 M Ameisensäure (pH 5,14) eingestellt mit Triäthylamin
- 34 0,2 M Pyridin, 4,5 M Essigsäure (pH 3,1)
- 35 2,0 M Pyridin, 2,5 M Essigsäure (pH 5,0)

3.20 Chemikalien

Es wurden Chemikalien folgender Firmen verwendet:

3H -Adenosin (24 Ci/mMol, TRK 410), 3H -Uridin (48 Ci/mMol, TRK 423), 3H -Poly(U) (500 Ci/Mol, TRK 481), ^{125}I od (300 mCi/ml, trägerfrei), 3H -Leucin (53 Ci/mMol) und ^{14}C -Leucin (348 Ci/Mol); Amersham Buchler GmbH und Co KG, Braunschweig-Wenden.

3H -Poly(A) (20 Ci/Mol); Miles Laboratories LTD, England.

3H -dCTP (24.1 Ci/mMol, NET 369) und Omnifluor; New England Nuclear (NEN), Frankfurt-Dreieichenhain.

RNAase Inhibitor; Searle und Co LTD, High Wycombe, England.

Oligo(dT)₁₂₋₁₈, Poly(U), Reverse Transcriptase (150 U/80 µl) und DNAase I (Reinheitsgrad I); Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.

Nuklease S₁, RNAase T₁ und RNAase T₂; Sigma GmbH München, Neuberg.

RNAase A(Hirs component A); Calbiochem, San Diego CA., USA.

Poly(U)-Sepharose 4B; Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden.

Oligo(dT)-Cellulose T 3; Collaborative Research, Inc., Waltham, Mass., USA.

Hyamin (1 M in Methanol); Packard Instrument International S.A., Zürich, Schweiz.

Dimethyl-POPOP und PPO; Werner Zinsser, Frankfurt.

Saccharose (frei von Ribonuklease), Triton X 100, Natriumdodecylsulfat (SDS), TMED, Acrylamid und Bisacrylamid; Serva, Heidelberg.

Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)p.A., Triäthylamin p.A., Trichloressigsäure (TCA) p.A. und Rinderglobulin; Merck, Darmstadt.

Hydroxylapatit (DNA grade, Bio-Gel HTP) und Aminex A₅; Bio-Rad Laboratories, Richmond CA., USA.

Alle übrigen Substanzen wiesen den Reinheitsgrad p.A. auf.

SDS, Acrylamid und Bisacrylamid wurden vor Gebrauch umkristallisiert.

Formamid wurde vor Gebrauch mit dem Ionenaustauscher Amberlite

MB 1 (Serva) behandelt und dann wie Phenol und Pyridin auch destilliert.

4. ERGEBNISSE

4.1 Isolierung von RNA-Spezies aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern

4.1.1 Isolierung der Kern-RNA

Die Behandlung der Hühner mit Phenylhydrazin, einer Substanz, die durch Phenylhydrazonbildung die Zellmembranen zerstört, führt zu einer makrozytären, normochromen Anämie (H.Schall und F.Turba³⁷). Die aus dem Knochenmark ausgeschwemmten unreifen Vorstufen der roten Blutzellen weisen im Gegensatz zu reifen Erythrozyten eine Proteinbiosynthese und eine erhöhte RNA-Synthese auf (K.Scherrer et al.⁵⁸, G.Attardi et al.⁵⁹).

Nach der Lysis der Zellen wurden die Zellkerne sedimentiert und kurzfristig mit dem nichtionischen Detergenz Triton X 100 (0,5 %) gewaschen. Wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, konnten durch diese Behandlung Kerne isoliert werden, die frei von cytoplasmatischer Kontamination waren.

Zur Präparation der Kern-RNA wurden die Zellkerne einer Phenolextraktion unterworfen, die zunächst bei Raumtemperatur durchgeführt und dann bei 65°C zur Gewinnung der an Chromatinstrukturen gebundenen RNA wiederholt wurde (J.R.Warner et al.³⁸). Obwohl bei dieser Methode die isolierte RNA weitgehend frei von DNA war, wurde zur Degradierung noch vorhandener DNA ein DNAase Abbau (D.S.Holmes und J.Bonner³⁹) mit anschließender Phenolextraktion zur Entfernung des Enzyms vorgenommen. Es ist zu beachten, daß die isolierte Kern-RNA die gesamte, im Zellkern vorhandene RNA im Gleichgewicht von Synthese und Abbau (steady state) darstellt, die von speziellen Fraktionen, z.B. neusynthetisierter RNA, unterschieden werden muß.

4.1.2 Isolierung der polysomalen RNA und der 9 S Globin-mRNA

Zur Isolierung der polysomalen RNA wurden die aus dem postmitochondrialen Überstand gewonnenen Polysomen einer Phenolextraktion unterworfen (H. Aviv und P. Leder⁴⁰).

Zur Gewinnung von 9 S Globin-mRNA wurden die Polysomen mit EDTA, das als Komplexbildner den Ribosomen Mg^{++} -Ionen entzieht, in ribosomale Untereinheiten und den mRNP-Komplex dissoziiert. Das Material wurde durch Zonalgradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Extinktion des eluierten Gradienten bei 254 nm zeigt die große (L) und die kleine (S) ribosomale Untereinheit sowie den als Schulter angedeuteten mRNP-Komplex, der etwa bei 20 S sedimentiert (Abbildung 1).

Die Fraktionen mit dem mRNP-Komplex, der nach S. Schröter⁶⁰ zu 25-30 % aus RNA und 70-75 % aus Proteinen bestehen soll, wurden entsprechend der Klammer in Abbildung 1 gepoolt. Nach Zugabe von SDS wurde der mRNP-Komplex weitgehend in Proteine und RNA dissoziiert und nach Äthanol-fällung im Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Der Hauptanteil sedimentierte bei 9 S und konnte von 18 S sowie 4 bzw. 5 S RNA getrennt werden (Abbildung 2). Die Fraktionen mit der 9 S RNA wurden vereinigt und zur vollständigen Reinigung von Proteinen mit Phenol extrahiert.

Die 9 S RNA wurde zur Reinigung auf Globin-mRNA schließlich an einer Oligo(dT)-Cellulose Säule chromatographiert. Bei dieser Methode wird Poly(A)-haltige RNA mit Puffern hoher Ionenstärke gebunden und kann so von Poly(A)-freier RNA getrennt werden (H. Aviv und P. Leder⁴⁰). Globin-mRNA enthält wie die meisten bisher isolierten mRNA-Spezies Poly(A)-Sequenzen, deren Länge nach Knöchel et al.⁶¹ im Durchschnitt 56 Nukleotide umfaßt. Von der aufgetragenen 9 S RNA wurde etwa ein Drittel als Poly(A)-haltige Globin-mRNA eluiert.

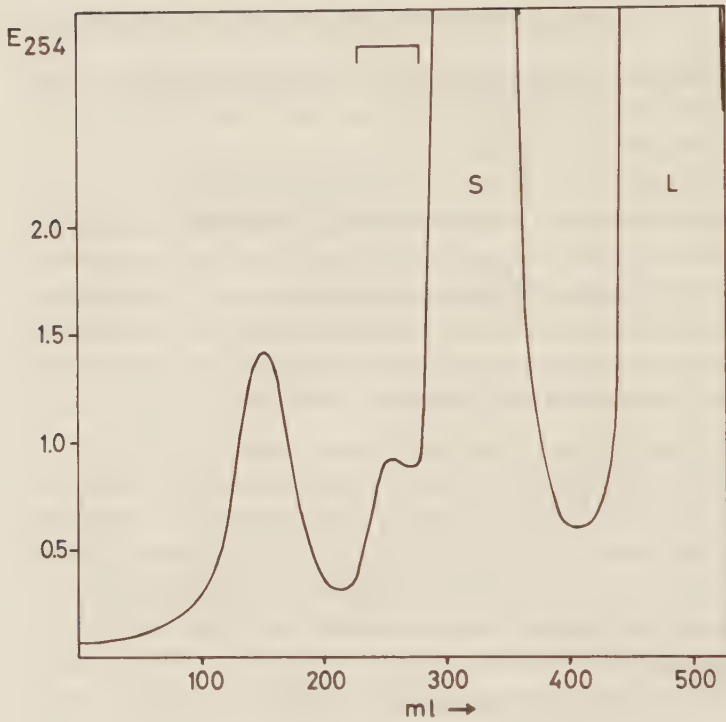


Abb. 1: Zonalgradientenzentrifugation von Polysomen

Etwa 300 mg Polysomen wurden in 10 ml Puffer 10 aufgenommen, 0,03 M an EDTA gemacht und auf einen 7 - 32 % Saccharose-Gradienten in Puffer 10 aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte im Spinco Zonal Rotor Ti 14 bei 0°C und 32 000 rpm für 24 Stunden. Das Profil zeigt die Extinktion des eluierten Gradienten bei 254 nm.

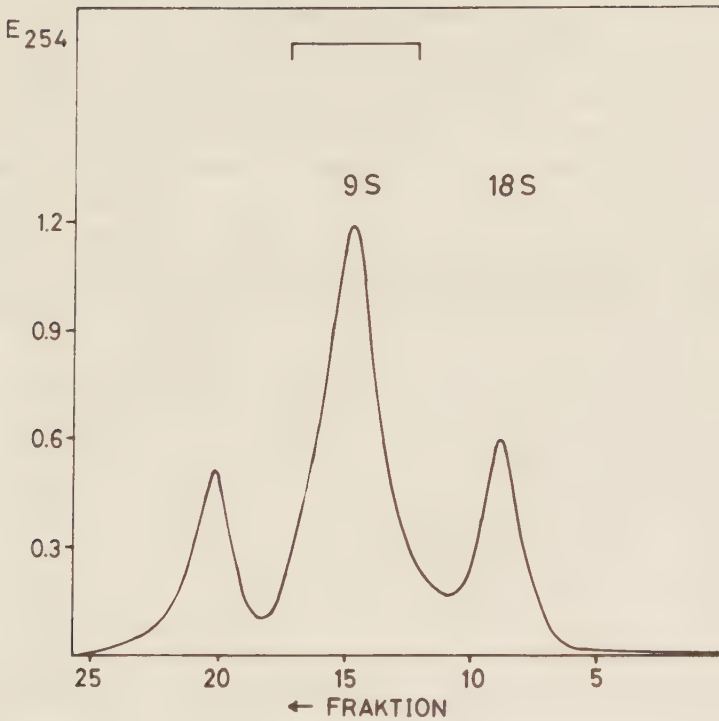


Abb. 2: Isolierung der 9 S Globin-mRNA im Saccharose-Gradienten
Die durch die Klammer in Abb. 1 gekennzeichneten Fraktionen (der mRNA-Komplex) wurden nach Zugabe von SDS mit 2 Volumen 96 % Äthanol, 2 % NaCl gefällt. Das Material wurde in Puffer 10 aufgenommen und jeweils 3 mg wurden auf einen 12 - 30 % Saccharose-Gradienten in Puffer 10 aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte im Spinco SW 27 Rotor bei 0°C und 27 000 rpm für 24 Stunden. Das Profil zeigt die Extinktion des eluierten Gradienten bei 254 nm.

4.2 Synthese von ^3H -markierter Globin-cDNA

Die Globin-cDNA diente dazu, RNA-Moleküle mit Globin codierenden Sequenzen der verschiedenen RNA-Fractionen aus den unreifen roten Blutzellen durch Hybridbildung von den übrigen RNA-Sequenzen zu unterscheiden. Die Globin-cDNA wurde mit Hilfe einer RNA abhängigen DNA-Polymerase, der sogenannten "Reverse Transkriptase" aus Myeloblastose Viren von Hühnern, komplementär zu 9 S Globin-mRNA als Template synthetisiert. Die Polymerase übersetzt die Template RNA vom 3'-Ende der Nukleotidkette, also beginnend an den Poly(A)-Sequenzen der Globin-mRNA. Sie benötigt zur Synthese neben den vier Desoxynukleotidtriphosphaten bei der angegebenen Ionenkonzentration Oligo(dT)₁₂₋₁₈. Diese Primer-Sequenzen dienen zur Initiierung der cDNA-Synthese. Ein Schema dazu ist in Abbildung 3 dargestellt.

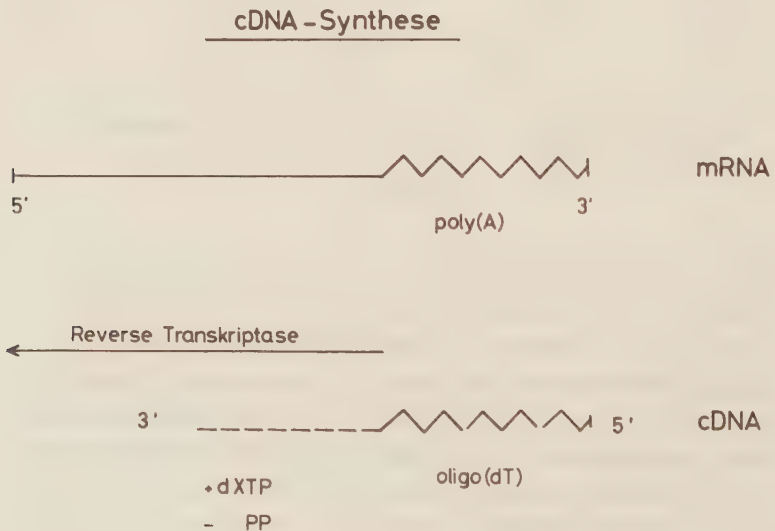


Abb. 3: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese

Reverse Transkriptase liest die Template RNA (mRNA) vom 3'-Ende ab. Neben den vier Desoxynukleotidtriphosphaten (dXTP) wird Oligo(dT)₁₂₋₁₈ als Primersequenz benötigt.

Die spezifische Aktivität der ^3H -markierten Globin-cDNA wurde durch die spezifische Aktivität des zur Synthese eingesetzten ^3H -dCTP (24,1 mCi/ μMol) mit ca. 10 000 cpm/ng bestimmt. Die Ausbeute an ^3H -markierter cDNA betrug etwa 2 %.

4.3 Größenverteilung der Globin-codierenden Sequenzen und der Poly(A)-Sequenzen in steady state RNA aus Zellkernen und Polysomen

4.3.1 Auftrennung in Formamid-Saccharose-Gradienten

Sowohl bei der Gradientenzentrifugation als auch bei der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (siehe Kapitel 4.3.4) wurden formamidhaltige Lösungen verwendet, weil Formamid denaturierend wirkt und die Tertiärstruktur der sehr komplex strukturierten Kern-RNA zerstört. Dadurch wird die Bildung von artifiziellen Aggregaten zwischen verschiedenen RNA-Molekülen verhindert (G. Spohr et al.⁴⁵).

Zur Ermittlung des Sedimentationsverhaltens Globin codierender Sequenzen und Poly(A)-Sequenzen wurde zunächst Kern-RNA und zum Vergleich polysomale RNA aus unreifen roten Hühnerblutzellen durch Formamid-Saccharose-Gradientenzentrifugation aufgetrennt (Y. Suzuki et al.⁴³).

Aliquots der RNA der einzelnen Fraktionen wurden dann mit ^3H -markierter Globin-cDNA oder synthetischer ^3H -markierter Polyuridylsäure (Poly(U)) hybridisiert (A. Cann et al.⁴⁷, P.R. Harrison et al.⁴⁸). Nach Abbau der nichthybridisierten, einzelsträngigen Nukleinsäuren durch Nuklease S_1 aus *Aspergillus oryzae* bzw. RNAase A und DNAase I wurden die Hybride mit Trichloressigsäure gefällt und die Radioaktivität gemessen (Abbildung 4).

Die Abbildung zeigt, daß eine maximale Hybridisierung von polysomaler RNA und steady state Kern-RNA mit ^3H -markierter Globin-cDNA in denselben Fraktionen (Fraktionen 13-15) stattfand. Der RNA dieser Fraktionen ist wie Globin-mRNA ein Sedimentationswert von 9 S zuzuordnen.

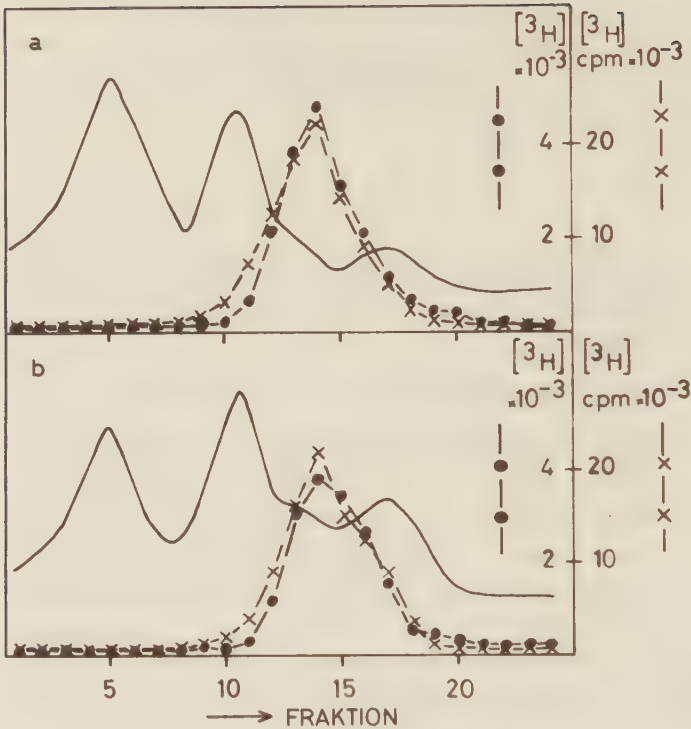


Abb. 4: Hybridisierung von RNA nach Fraktionierung in Formamid-Saccharose-Gradienten

500 μg polysomale RNA (a) und 500 μg Kern-RNA (b) wurden in 500 μl Puffer 14 aufgenommen und in einem 4,6 - 22 % Formamid-Saccharose-Gradienten im Spinco SW 41 Rotor bei 25°C und 39 000 rpm 40 Stunden zentrifugiert. Die Gradienten wurden fraktioniert (0,45 ml/Fraktion). 500 μl der Fraktionen wurden mit 250 μl H_2O zur Extinktionsmessung bei 260 nm (—) verdünnt. Jeweils 1 μl der Fraktionen wurde zur Hybridisierung mit 0,5 ng ^3H -markierter Globin-cDNA (-●-●-) und 100 μl zur Hybridisierung mit ^3H -Poly(U) (-x-x-) inkubiert. Zum Abbau der nichthybridisierten Nukleinsäuren wurden die Ansätze mit Nuklease S_1 bzw. RNAase A und RNAase T_1 inkubiert und die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials gemessen.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß die RNA derselben Fraktionen auch die maximale Hybridisierung mit Poly(U) aufwies.

4.3.2 Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in hoch- und niedermolekularer steady state Kern-RNA durch Sättigungshybridisierung

Zur Untersuchung, ob hochmolekulare Kern-RNA trotz des Maximums der Hybridisierungen bei 9 S (Abbildung 4) Globin codierende Sequenzen aufweist, wurde Kern-RNA in einen Pool I mit Sedimentationswerten unter 20 S (Kern-RNA I) und einen Pool II mit Sedimentationswerten über 20 S (Kern-RNA II) fraktioniert. Beide Pools enthielten ca. 50 % der auf die Gradienten aufgetragenen RNA.

Konstante Mengen ^3H -markierter Globin-cDNA wurden mit steigenden Mengen der Kern-RNA aus Pool I und Pool II sowie polysomaler RNA und 9 S Globin-mRNA hybridisiert. Die Spezifität der Hybridisierung von ^3H -markierter Globin-cDNA mit Globin codierenden Sequenzen wurde durch Kontrollen mit 28 S rRNA und Hefe-tRNA gesichert, da mit diesen RNA-Spezies keine Hybridisierung zu beobachten war (Abbildung 5).

Zur Bestimmung des Gehalts an Globin codierenden Sequenzen in den verschiedenen RNA-Spezies wurden die Globin codierenden Sequenzen der 9 S Globin-mRNA mit 100 % festgelegt. Es wurden die RNA-Mengen der verschiedenen RNA-Fractionen, die eine 50%ige Hybridisierung der ^3H -markierten Globin-cDNA bewirkten, miteinander verglichen. Sie sind dem Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in den jeweiligen Fraktionen umgekehrt proportional. In Tabelle 1, Spalte 1, ist der Gehalt Globin codierender Sequenzen der verschiedenen RNA-Spezies in % aufgeführt.

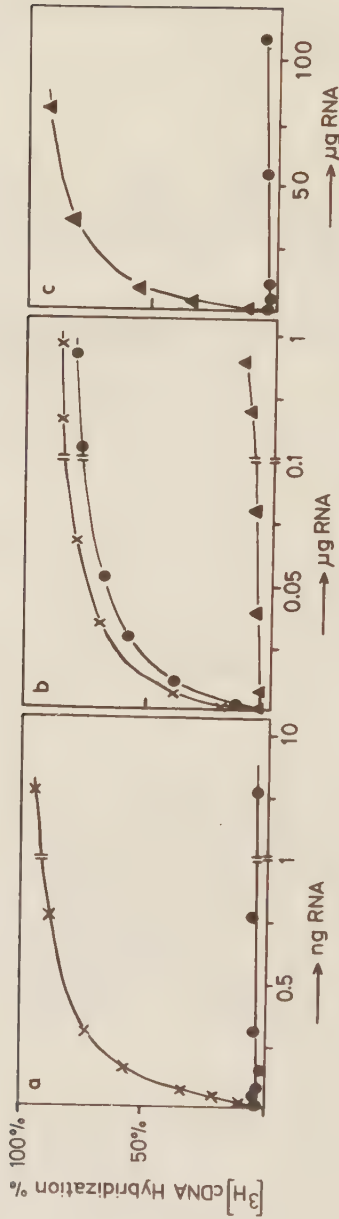


Abb. 5: Sättigungshybridisierung mit ^3H -markierter Globin-cDNA

Jeweils ansteigende Mengen von a) 9 S Globin-mRNA (-x-x-) und 28 S rRNA (-●-●-), b) Kern-RNA I (-●-●-), Kern-RNA II (-x-x-) und polysomale RNA (-x-x-), c) Kern-RNA II (-x-x-) und Hefe-tRNA (-●-●-) wurden gegen 600 cpm ^3H -markierte Globin-cDNA hybridisiert. Nach dem Abbau der nichthybridisierten Nukleinsäuren mit Nuklease S_1 wurden die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials gemessen. Daraus wurde der Anteil in % der hybridisierten ^3H -markierten Globin-cDNA bestimmt.

Tabelle 1

RNA-Fraktion	1 Gehalt an Globin codie- renden Sequen- zen in %	2 Verteilung der Globin codieren- den Sequenzen in der Kern-RNA in %	3 Verteilung von ¹²⁵ J-markier- ter 9 S Globin- mRNA in %
Kern-RNA I	0,59	99,7	99,6-99,8
Kern-RNA II	0,0016	0,3	0,2-0,4
polysomale RNA	0,94	-	-
9 S Globin-mRNA	100,0	-	-

Aus der Tabelle 1 geht hervor, daß der Gehalt an Globin codierenden Sequenzen mit 0,59 % in der Kern-RNA I wesentlich höher liegt als in der Kern-RNA II. Aus diesen Werten und aus der Gesamtmenge der RNA in beiden Pools folgt, daß 99,7 % der Sequenzen in der Kern-RNA I und nur 0,3 % in der Kern-RNA II enthalten sind (Tabelle 1, Spalte 2).

Der Anteil Globin codierender Sequenzen in der gesamten RNA verschiedener Kern-Präparationen betrug 0,4 - 0,9 %. Der variierende Gehalt dürfte mit der Ausbeute verschiedener Spezies der Kern-RNA bei der Präparation sowie eventuell mit verschiedenen Reifestadien der unreifen roten Blutzellen bei der Isolierung zu erklären sein. Cytoplasmatische Kontaminationen der Kern-RNA konnten auf Grund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung, ob der geringe Gehalt Globin codierender Sequenzen in der Kern-RNA II auf Kontaminationen mit 9 S RNA zurückzuführen ist, wurde ¹²⁵Jod markierte 9 S Globin-mRNA mit hoher spezifischer Radioaktivität präpariert (W. Knöchel⁴²).

0,25 µg dieser ¹²⁵J-markierten 9 S Globin-mRNA wurden zusammen mit 500 µg Kern-RNA im Formamid-Saccharose-Gradienten zentrifugiert.

Der Gradient wurde danach ebenso in einen Pool I (< 20 S) und einen Pool II (> 20 S) fraktioniert. Die Verteilung der Radioaktivität auf beide Pools wird in Tabelle 1, Spalte 3 gezeigt.

Aus der Verteilung der ^{125}J -markierten 9 S Globin-mRNA auf die Pools der fraktionierten Kern-RNA ist zu ersehen, daß die Werte mit der Verteilung der Globin codierenden Sequenzen in der Kern-RNA vergleichbar sind. Daraus ist mit großer Wahrscheinlichkeit zu schließen, daß der niedrige Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in der Kern-RNA II auf Kontaminationen hochmolekularer Kern-RNA mit 9 S RNA zurückzuführen ist.

4.3.3 Translation von Kern-RNA (< 20 S und > 20 S) im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen (M. Mathews und A. Korner⁵², W. Knöchel et al.⁵³)

4.3.3.1 Proteinbiosynthese

Kern-RNA I (< 20 S) und Kern-RNA II (> 20 S) wurden zur Untersuchung von Protein codierenden Sequenzen in einem zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen in Gegenwart einer ribosomalen Waschfraktion aus Polysomen unreifer roter Hühnerblutzellen translatiert.

Als Ionenkonzentration wurden die optimalen Werte für die Translation von Globin-mRNA gewählt: 95 mM KCl und 2,5 mM MgCl_2 . Die RNA-Konzentration lag bei 3,5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$. Es wurden 10fache Ansätze inkubiert, um nachher ausreichende Einbauraten für die Produktanalyse zu erhalten. Die Proteinsynthese wurde nach 60 min mit EDTA gestoppt, nachdem jeweils ein Aliquot zur Messung des Proteingesamteinbaus (^3H -Leucin Einbau) entnommen worden war. Die Aliquots wurden nach KOH-Hydrolyse zur Zerstörung der Aminoacyl-tRNA mit Trichloressigsäure gefällt. In Tabelle 2 sind der durch die Kern-RNA I und Kern-RNA II stimulierte ^3H -Leucin Einbau bei der Proteinbiosynthese sowie die sich daraus ergebende Stimulationsrate aufgeführt.

Tabelle 2

RNA	Gesamteinbau an ^3H -Leucin (cpm)	Stimulation in %
Kern-RNA I	20 155	248
Kern-RNA II	18 561	220
H ₂ O	5 799	-

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Proteinbiosynthese im zellfreien System von beiden Kern-RNA Fraktionen nahezu im gleichen Umfang stimuliert wurde.

4.3.3.2 Produktanalyse

Die Produktanalyse wurde durchgeführt, um zu untersuchen, in welchem Ausmaß die stimulierte Proteinbiosynthese auf Globinketten zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu Hybridisierungsexperimenten besteht bei der Translation und der nachfolgenden Produktanalyse der Vorteil, daß zum Nachweis Globin codierender Sequenzen eine komplette Globin-mRNA Sequenz benötigt wird. Nach Zugabe von ^{14}C -markierten Globinketten als Referenz wurden die Proteine aus den Ansätzen der Proteinbiosynthese zuerst über eine Sephadex G 100 Säule aufgetrennt. Abbildung 6 a zeigt die Extinktion eines Eluats bei 280 nm.

Der erste Peak in Abbildung 6a bei 55 ml ist auf endogenes Material im Ascites-System zurückzuführen, während der zweite Peak bei 90 ml durch die zugesetzten Globinketten hervorgerufen wurde. Die Globin enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und nach Dialyse über eine

Carboxymethylcellulose Säule (CM 52, Whatman) chromatographiert. Dadurch konnten die Globinketten in α^D - und α^A - sowie ein Gemisch aus β^A - und β^D -Ketten aufgetrennt werden (A. G. Stewart et al.⁶²). Abbildung 6b zeigt das Profil der ^{14}C -markierten Globinketten sowie die Verteilung von ^3H -Leucin in den in vitro synthetisierten Proteinen.

Die Auftrennung auf CM-Cellulose ergab, daß nur bei den durch Kern-RNA I stimulierten Proteinen deutliche Radioaktivitätspeaks unter den Peaks der Globinketten lagen. Bei den durch Kern-RNA II stimulierten Proteinen war zwar eine breite Verteilung von Radioaktivität zu beobachten, jedoch waren keine definierten Peaks in den Fraktionen der Globinketten zu erkennen.

Zur weiteren Analyse der in vitro synthetisierten Proteine wurden die Fraktionen, die die α^A -Ketten enthielten, vereinigt. Nach einer Perameisensäure-Oxydation wurde das Material durch Trypsin abgebaut (D. Hendrick et al.⁵⁷). Die Verteilung der Peptide nach Chromatographie an einem Ionenaustauscherharz (Aminex A₅, Bio-Rad Laboratories) zeigt Abbildung 6c. Das Ergebnis dieser Chromatographie bestätigte, daß nur durch Stimulation der Kern-RNA I eine Globinsynthese stattfand. Bei der Stimulation durch Kern-RNA II im zellfreien System konnten keine meßbaren Radioaktivitätsmengen in den Fraktionen der tryptischen Peptide gefunden werden.

4.3.4 Auftrennung auf exponentiellen Polyacrylamid-Gelen in Formamid

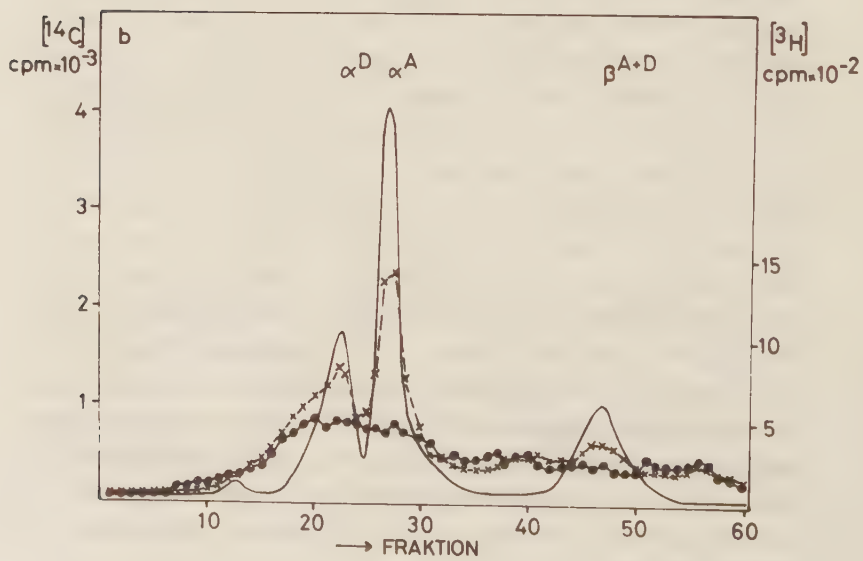
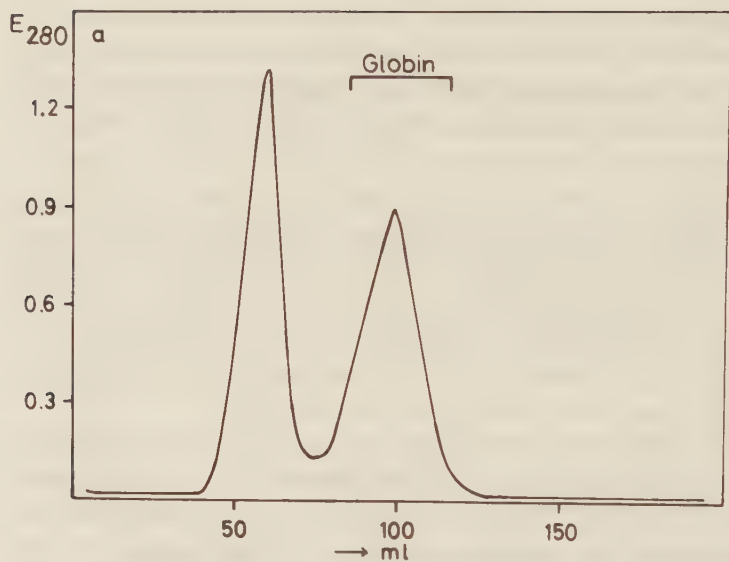
Der Vorteil einer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese liegt gegenüber der Gradientenzentrifugation in einer besseren Auftrennung der RNA-Moleküle. Es wurden Gele mit einem exponentiellen Acrylamid-Konzen-

trationsanstieg von 2,85 % - 7,5 % hergestellt. Damit war es möglich, RNA-Moleküle mit Molekulargewichten von 10^4 - 10^7 dalton aufzutrennen. Der Logarithmus der Molekulargewichte ergab eine lineare Abhängigkeit von der Laufstrecke der RNA-Moleküle im Gel (M. E. Mirault und K. Scherrer⁴⁴, G. Spohr et al.⁴⁵).

Die Gelkonzentration von 2,85 % Acrylamid in Formamid war die untere Grenze, bei der die Gele noch polymerisieren konnten. Der exponentielle Anstieg der Konzentration konnte nach der Formel $C_v = (C_1 - C_2) \times e^{-V/V_i} + C_2$ beliebig variiert und durch Anfärbung überprüft werden.

Dazu wurde eine Konzentrationskomponente (7,5 % Polyacrylamid) mit Bromphenolblau angefärbt und das Gel wie beschrieben hergestellt. Abbildung 7 zeigt die Extinktion dieses Gels bei 572 nm.

Um die Größe der Kern-RNA und polysomalen RNA mit Globin codierenden Sequenzen festzustellen, wurden diese RNA-Spezies in den exponentiellen Polyacrylamid-Gele aufgetrennt; im Vergleich dazu wurde eine Mischung aus polysomaler RNA und 9 S Globin-mRNA aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die Extinktion der Gele bei 260 nm aufgenommen (Abbildung 8a-c). Danach wurden die Gele geschnitten, die RNA aus den Scheiben eluiert (A. Berns et al.⁴⁶) und mit ^3H -markierte Globin-cDNA hybridisiert (Abbildung 8a-b). Aus der Verteilung der Radioaktivität ist ersichtlich, daß RNA-Sequenzen aus der Kern-RNA sowie der polysomalen RNA, die gleich schnell wandern, mit ^3H -markierter Globin-cDNA hybridisieren (Fraktionen 8 und 9). Die Mischung aus Kern-RNA und 9 S Globin-mRNA zeigt in der Extinktion einen Kurvenverlauf, der zusammen mit dem Hybridisierungsspeak (Abbildung 8b) andeutet, daß die Globin codierenden Sequenzen der Kern-RNA in der gleichen Größenordnung zu finden sind, wie cytoplasmatische 9 S Globin-mRNA. Im Bereich größerer Moleküle (geringere Wanderungsgeschwindigkeit) waren keine Hybridisierungsprodukte mehr zu finden. Es ist zu beachten, daß durch 9 S Globin-mRNA ein breiterer Peak als durch 18 S und 28 S RNA hervorgerufen wurde. Das ist darauf zurückzuführen, daß 9 S Globin-mRNA ein Gemisch von mRNA-Molekülen für alle vier Hühneryoglobinketten darstellt und Poly(A)-Sequenzen von unterschiedlicher Länge enthält (W. Knöchel et al.⁶¹).



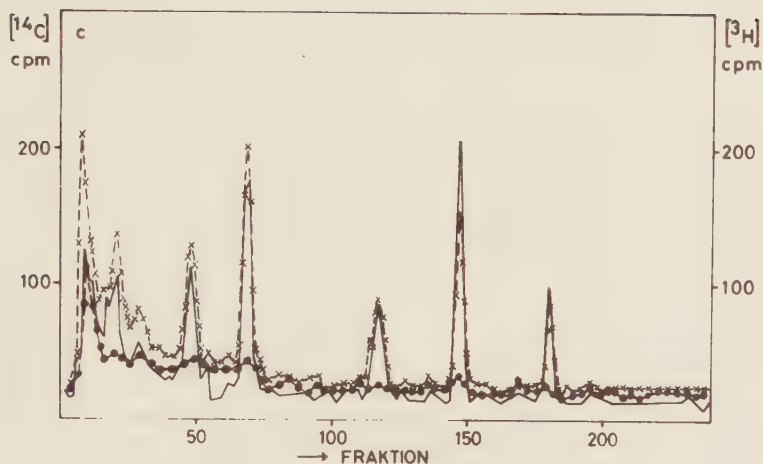


Abb. 6: Produktanalyse der in vitro synthetisierten Proteine

Die Translationsansätze der zellfreien Proteinbiosynthese wurden mit 1/10 Volumen 0,3 M EDTA gestoppt und nach Zugabe von 60 mg unmarkierten Globinketten als Referenz gegen 7 M Harnstoff (mit 10 N HCl auf pH 2,5 eingestellt) dialysiert. Die Proben wurden (a) auf Sephadex G 100 Säulen (100 x 1,6 cm) aufgetrennt und die Extinktion bei 280 nm gemessen. Die durch die Klammern gekennzeichneten Fraktionen (die Globinketten) wurden gepoolt und gegen Puffer 32 dialysiert. Die Globinketten wurden (b) auf Carboxymethylcellulose Säulen (15 x 0,6 cm) durch einen linearen Gradienten (50 ml Puffer 32 als Startpuffer und 50 ml Puffer 33 als Endpuffer) aufgetrennt und eluiert. Nach Oxydation mit Perameisensäure und tryptischer Verdauung wurden die Peptide der α^A -Globinketten (c) auf Aminex A₅ Ionenaustauscher Säulen (40 x 0,4 cm) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit einem linearen Gradienten (80 ml Puffer 34 als Startpuffer und 80 ml Puffer 35 als Endpuffer).

^{14}C -markierte Globinketten wurden bei der Produktanalyse als Referenz eingesetzt (—) (b + c); cpm durch den Einbau von ^3H -Leucin in Gegenwart von Kern-RNA I (-x-x-) und Kern-RNA II (-●-●-).

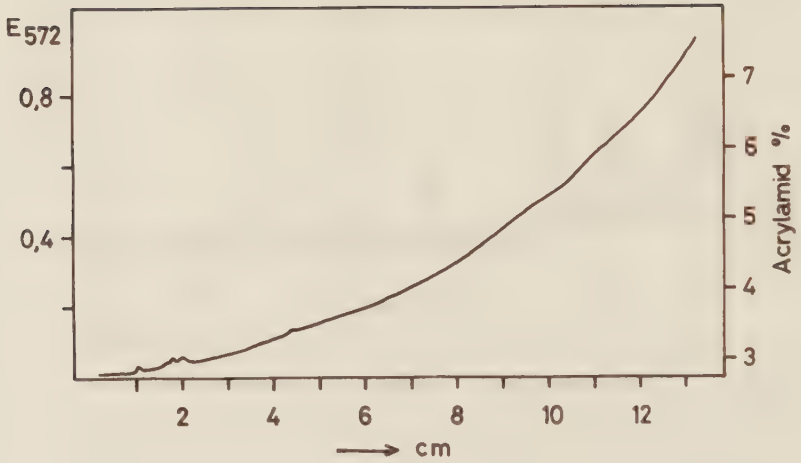


Abb. 7: Exponentielle Polyacrylamid-Gele in Formamid

Die Gele in Formamid mit einem exponentiellen Konzentrationsanstieg von 2,85 - 7,5 % Polyacrylamid wurden nach der Formel $C_v = (C_1 - C_2) e^{-V/V_i} + C_2$ aus 2,85 ml der leichten Lösung (2,85 %) und 0,82 ml der schweren Lösung (7,5 %) hergestellt. Die Gele wurden in Quarzröhrchen gegossen und hatten eine Länge von 13 cm. Das Profil zeigt die Extinktion (bei 572 nm) eines exponentiellen Polyacrylamid-Gels, bei dem die schwere Lösung mit Bromphenolblau angefärbt war.

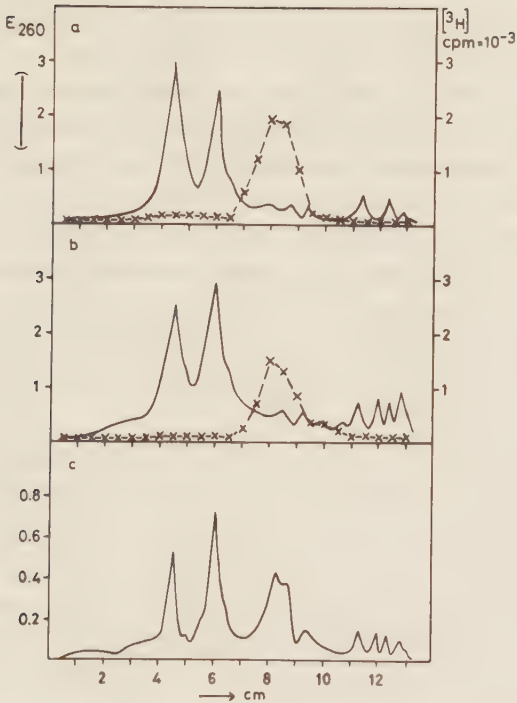


Abb. 8: Elektrophorese in exponentiellen Polyacrylamid-Gelen
in Formamid

a) 100 μ g polysomale RNA, b) 100 μ g Kern-RNA und c) eine Mischung aus 10 μ g Kern-RNA und 5 μ g 9 S Globin-mRNA wurden in 200 μ l Formamid, 20 μ l Puffer 16 aufgenommen und in exponentiellen Polyacrylamid-Gelen bei 10 V/cm 20 Stunden aufgetrennt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese bei 260 nm gemessen (—) und dann in Scheiben von 0,5 cm geschnitten, um die RNA zu extrahieren (a und b). Aliquots der Fraktionen wurden mit ³H-markierter Globin-cDNA (-x-x-) hybridisiert. Die Proben wurden zum Abbau der nichthybridisierten Nukleinsäuren mit Nuklease S₁ inkubiert und die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials gemessen.

4.4 Größenverteilung der Globin codierenden Sequenzen in neusynthetisierter RNA aus Zellkernen

Im Kapitel 4.3 wurde die Verteilung von Globin codierenden Sequenzen in steady state RNA aus Zellkernen ermittelt. Es konnte festgestellt werden, daß diese Globin codierenden Sequenzen ausschließlich in RNA-Molekülen mit Sedimentationswerten um 9 S enthalten sind.

Falls tatsächlich höhermolekulare Precursor für Globin-mRNA existieren, sollten diese Moleküle in sehr geringen Mengen vorkommen bzw. sehr schnell abgebaut werden. Kleine Mengen von Precursor-Molekülen mit sehr kurzer Halbwertszeit in neusynthetisierter Kern-RNA können aber nur nachgewiesen werden, wenn es gelingt, diese Precursor durch Pulsmarkierung kenntlich zu machen.

Zur Untersuchung des Vorkommens von Globin codierenden Sequenzen in neusynthetisierter Kern-RNA wurden unreife rote Blutzellen mit ^3H -Uridin 15 min pulsmarkiert. Aus diesen Zellen wurde die Kern-RNA isoliert, die dann mit unmarkierter Globin-cDNA hybridisiert werden sollte. Die "unmarkierte" Globin-cDNA wurde in Gegenwart von $0,1 \mu\text{Ci}$ ^3H -markiertem dCTP hergestellt, um den Syntheseablauf kontrollieren zu können. Die spezifische Aktivität dieser "unmarkierten" Globin-cDNA betrug $0,1 \text{ cpm/ng}$. Die Ausbeute betrug 30 - 40 %.

Die mit ^3H -Uridin pulsmarkierte Kern-RNA wurde in Formamid-Saccharose-Gradienten zentrifugiert, anschließend fraktioniert und nach Äthanol-fällung zur Konzentrierung in geringem Volumen aufgenommen. Abbildung 9a zeigt die Radioaktivitätsverteilung der pulsmarkierten Kern-RNA im Gradienten. Von den Gradientenfraktionen wurden Aliquots (22,5 %) zur Hybridisierung mit einem Überschuß an unmarkierter Globin-cDNA (400 ng Globin-cDNA) inkubiert und die nichthybridisierte RNA danach mit RNAase A und RNAase T_1 abgebaut. Ebenso wurden Kontrollen behandelt, die ohne cDNA inkubiert worden waren (Abbildung 9c). Die nichthybridisierte, pulsmarkierte Kern-RNA wurde deshalb mit den Enzymen RNAase A und RNAase T_1 degradiert, weil sich

in Kontrollversuchen herausgestellt hatte, daß ein Teil dieser Kern-RNA durch Nuklease S_1 , die einzelsträngige Nukleinsäuren degradieren soll, nicht vollständig abgebaut wird. Außerdem wurden Aliquots (0,25 %) der Gradientenfractionen wie in Kapitel 4.3.1 mit ^3H -markierter Globin-cDNA in Ansätzen von 15 μl hybridisiert und danach mit Nuklease S_1 abgebaut (Abbildung 9b). Diese ^3H -markierte Globin-cDNA hatte eine höhere spezifische Aktivität als die ^3H -Uridin markierte Kern-RNA, so daß dieser Versuch mit dem von Abbildung 4b verglichen werden kann.

Die Radioaktivitätsverteilung nach der Hybridisierung in Abbildung 9b zeigt einen Peak bei 9 S. Das Ergebnis ist das gleiche wie in Abbildung 4b. Der Peak stellt den Hauptanteil der Globin codierenden Sequenzen in der steady state Kern-RNA dar. Bei der Hybridisierung unmarkierter Globin-cDNA mit ^3H -Uridin pulsmarkierter Kern-RNA zeigt die Radioaktivitätsverteilung nach dem Enzymabbau der nichthybridisierten RNA zwei Peaks, und zwar bei 9 S und im Bereich höherer Sedimentationswerte, etwa bei 15 S (Abbildung 9c). Das Ergebnis deutet auf das Vorhandensein einer RNA mit Globin codierenden Sequenzen hin, die größer als 9 S ist. Dieses Ergebnis konnte in mehreren Versuchen reproduziert werden, jedoch war in einigen Fällen der 9 S Peak nur als Schulter ausgeprägt (siehe Abbildung 10a). Um bei der Hybridisierung eine unspezifische Bindung zwischen den Oligo(dT)-Sequenzen der Globin-cDNA mit Sequenzen der Kern-RNA ausschließen zu können, wurden die gleichen Versuche mit ^3H -Uridin pulsmarkierter Kern-RNA in Gegenwart eines Überschusses von unmarkiertem Poly(U) durchgeführt. In diesen Kontrollversuchen wurde die gleiche Radioaktivitätsverteilung beobachtet wie bei Versuchen ohne Poly(U) (nicht abgebildet).

Von der Radioaktivität der pulsmarkierten Kern-RNA und der Hybride konnte auf den Gehalt Globin codierender Sequenzen in neusynthetisierter Kern-RNA geschlossen werden. In Tabelle 3 sind die Summe der Impulszahlen und die prozentualen Gehaltsangaben gegenübergestellt.

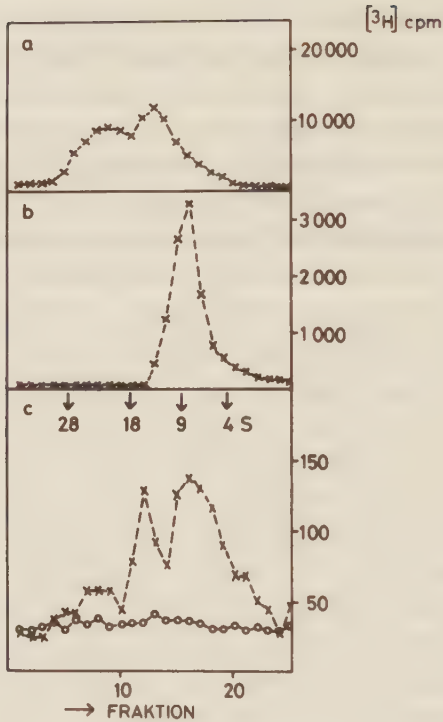


Abb. 9: Hybridisierung von ³H-Uridin pulsmarkierter Kern-RNA nach Fraktionierung in Formamid-Saccharose-Gradienten

500 µg ³H-Uridin markierte Kern-RNA wurden in 500 µl Puffer 14 aufgenommen und in einem 4,6 - 22 % Formamid-Saccharose-Gradienten im Spinco SW 41 Rotor bei 25°C und 39 000 rpm 40 Stunden zentrifugiert. Die Gradienten wurden fraktioniert (0,45 ml/Fraktion) und die RNA anschließend konzentriert. a) Von 10 % der Fraktionen wurden die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials gemessen. b) 0,25 % der Fraktionen wurden mit 0,5 ng ³H-markierter Globin-cDNA inkubiert. Nach dem Abbau der nichthybridisierten Nukleinsäuren mit Nuklease S₁ wurden die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials bestimmt. c) 22,5 % der Fraktionen wurden mit 400 ng unmarkierter Globin-cDNA inkubiert. Nach dem Abbau der nichthybridisierten Nukleinsäuren mit RNAase A und RNAase T₁ wurden die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials bestimmt. Hybridisierung in Gegenwart von cDNA (-x-x-) und als Kontrolle ohne cDNA (-o-o-).

Tabelle 3

Kern-RNA	Zahl der Impulse (cpm)	Verteilung der cpm (%)
Kern-RNA (gesamt)	$1,5 \times 10^6$	100,0
9 S Kern-RNA (Hybrid)	$2,25 \times 10^3$	0,15
15 S Kern-RNA (Hybrid)	$1,05 \times 10^3$	0,07

Die Werte der Tabelle zeigen, daß weniger als 0,1 % der neusynthetisierten Kern-RNA Globin codierende Sequenzen repräsentieren, die bei 15 S sedimentieren; etwa die doppelte Menge sedimentiert bei 9 S.

Damit ist bewiesen, daß neben Globin codierenden Sequenzen in der 9 S Kern-RNA auch höhermolekulare, etwa bei 15 S sedimentierende RNA-Moleküle mit Globin codierenden Sequenzen existieren. Auf die Bedeutung der bei 15 S sedimentierenden Moleküle als Precursor für Globin-mRNA wird in der Diskussion näher eingegangen.

4.5 Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in neusynthetisierter Poly(A)⁺ und Poly(A)⁻ Kern-RNA

4.5.1 Auftrennung von RNA nach dem Poly(A)-Gehalt durch Poly(U)-Sephrose Chromatographie

Für die Auftrennung der Kern-RNA nach dem Poly(A)-Gehalt wurde Poly(U)-Sephrose benutzt, weil bei dieser Methode die Anwendung von Formamid als denaturierendem Lösungsmittel zur Auffaltung der sehr komplex strukturierten Kern-RNA möglich ist. Bei der Poly(U)-Sephrose handelt es sich um ein spezielles Agarose-Gel, das nach Aktivierung mit Cyanbromid mit Polyuridylsäure (Poly(U)) gekoppelt wurde (U. Lindberg und T. Person⁴¹).

In einem Vorversuch wurde die Trenneigenschaft der Poly(U)-Sephrose Säule mit synthetischer Polyadenylsäure (Poly(A)) getestet. 2 mg einer Träger-RNA wurden mit ^3H -markiertem Poly(A) versetzt und aufgetragen. Von dem radioaktiven Material konnten 96,5 % eluiert werden. Tabelle 4 zeigt die Verteilung der Radioaktivität auf die Fraktionen, die mit den drei Puffern steigender Formamidkonzentration und fallender Ionenstärke eluiert wurden.

Tabelle 4

Elutionspuffer	Verteilung der cpm von ^3H -Poly(A) in % zur Auftragsmenge
Puffer 6 (0,7 M NaCl, 25 % Formamid)	2,4
Puffer 7 (0,5 M NaCl, 50 % Formamid)	8,6
Puffer 8 (90 % Formamid)	85,5

Die Verteilung zeigt, daß die synthetische ^3H -Polyadenylsäure weitgehend an die Poly(U)-Sephrose gebunden wurde. Geringe Mengen konnten bereits mit 50 % Formamid (Puffer 7) eluiert werden. Dieser Befund kann mit einer geringeren Bindungskraft kurzer Poly(A)-Sequenzen erklärt werden. Die größte Anteil der Poly(A)-Sequenzen wurde mit 90 % Formamid eluiert.

Eine Schwierigkeit ergab sich bei der Isolierung Poly(A)-haltiger RNA durch die Anwendung von Puffer 8 mit 10 mM K-phosphat in 90 % Formamid. K-phosphat fiel bei der Äthanol-fällung als schwerlösliches Salz aus. Um dennoch eine salzfreie Lösung zu bekommen, wurde die Probe

über eine Sephadex G 25 Säule in 10 mM NaCl chromatographiert, erneut in Äthanol gefällt und in H₂O aufgenommen.

4.5.2 Auftrennung der ³H-pulsmarkierten Kern-RNA in Poly(A)⁺ und Poly(A)⁻

Ein weiteres Experiment sollte zeigen, ob die bei 15 S sedimentierende, neusynthetisierte Kern-RNA wie die bei 9 S sedimentierende steady state RNA Poly(A)-Sequenzen enthält. ³H-Uridin pulsmarkierte Kern-RNA wurde an einer Poly(U)-Sepharose Säule nach dem Poly(A)-Gehalt aufgetrennt und eluiert. Die Verteilung der Radioaktivität der mit den drei verschiedenen Puffern eluierten Fraktionen zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5

Elutionspuffer	RNA-Fraktion	Verteilung der cpm der ³ H-pulsmarkierten Kern-RNA in % zur Auftragsmenge
Puffer 6 (0,7 M NaCl, 25 % Formamid)	Poly(A) ⁻	78,2
Puffer 7 (0,5 M NaCl, 50 % Formamid)	Zwischenfraktion	2,5
Puffer 8 (90 % Formamid)	Poly(A) ⁺	18,8

Die Verteilung der pulsmarkierten Kern-RNA auf die Fraktionen zeigt, daß fast 20 % der neusynthetisierten Kern-RNA in Gegenwart von Puffer 6 an die Säule gebunden und erst mit Puffer 8 eluiert werden.

Diese Poly(A)⁺ Kern-RNA zusammen mit unmarkierter Kern-RNA (um durch gleiche RNA-Mengen vergleichbare Sedimentationsbedingungen herzustellen) und unfractionierte RNA wurden in Formamid-Saccharose-Gradienten zentrifugiert und danach fraktioniert. Die RNA jeder Fraktion wurde wieder mit unmarkierter Globin-cDNA (400 ng Globin-cDNA) hybridisiert und danach mit RNAase A und RNAase T₁ inkubiert, um nicht-hybridisierte RNA abzubauen. Kontrollen, die nicht mit Globin-cDNA inkubiert worden waren, wurden enzymatisch degradiert. Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Radioaktivitäten nach der Hybridisierung von Poly(A)⁺ Kern-RNA im Vergleich zu unfractionierter Kern-RNA. Die Radioaktivitätsverteilung ist in beiden Gradienten nahezu gleich. Da die auf den Gradienten aufgetragene Poly(A)⁺ Kern-RNA jedoch der doppelten Menge Kern-RNA entspricht, die auf den Vergleichsgradienten aufgetragen wurde, kann gefolgert werden, daß ungefähr 50 % der Globin codierenden, neusynthetisierten Kern-RNA in der Poly(A)⁺-Fraktion enthalten sind. Es fällt weiter auf, daß die unfractionierte Kern-RNA im Unterschied zur Poly(A)⁺ Kern-RNA im Bereich zwischen 20 S und 28 S einen kleinen Radioaktivitätspeak aufweist.

4.6 Analyse der Poly(A)-Sequenzen in Molekülen der Globin codierenden 15 S Kern-RNA

4.6.1 Isolierung der RNA-DNA Hybride

Für diese Versuchsreihe wurden unreife rote Blutzellen 25 min mit ³H-Adenosin markiert und die Kern-RNA daraus isoliert. Diese ³H-Adenosin markierte Kern-RNA wurde in Formamid-Saccharose-Gradienten zentrifugiert und danach fraktioniert.

Von den Gradientenfraktionen wurde ein Aliquot mit einem Überschuß unmarkierter Globin-cDNA (400 ng Globin-cDNA) hybridisiert und mit RNAase A und RNAase T₁ inkubiert, um nicht-hybridisierte RNA abzubauen. Zur Kontrolle wurden Aliquots der Gradientenfraktionen nur mit RNAase A und RNAase T₁ inkubiert (Kontrolle I) und eine weitere Kon-

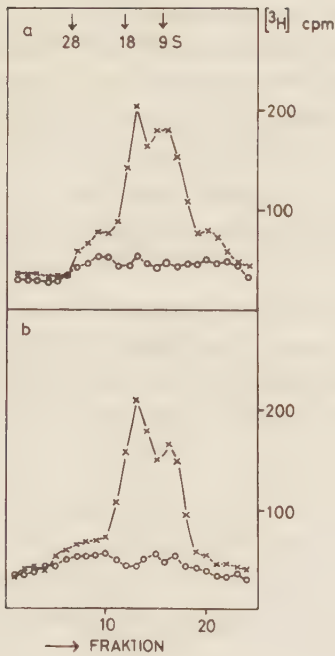


Abb. 10: Hybridisierung von ^3H -Uridin pulsmarkierter Kern-RNA und Poly(A)^+ Kern-RNA nach Fraktionierung in Formamid-Saccharose-Gradienten

a) $500\text{ }\mu\text{g}$ ^3H -Uridin pulsmarkierte Kern-RNA und b) 25 % der ^3H -Uridin pulsmarkierten Poly(A)^+ Kern-RNA nach Poly(U)-Sephadex Chromatographie von 4 mg Kern-RNA wurden in $500\text{ }\mu\text{l}$ Puffer 14 aufgenommen und in einem 4,6 - 22 % Formamid-Saccharose-Gradienten im Spinco SW 41 Rotor bei 25°C und 39 000 rpm 40 Stunden zentrifugiert. Die Gradienten wurden fraktioniert (0,45 ml/Fraktion).

22,5 % der konzentrierten Fraktionen wurden mit 400 ng unmarkierter Globin-cDNA (-x-x-) und als Kontrolle ohne cDNA (-o-o-) inkubiert. Nach dem Abbau der nichthybridisierten Nukleinsäuren mit RNAase A und RNAase T₁ wurden die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials gemessen.

trollreihe außerdem mit RNAase T₂ (Kontrolle II).

Die cpm-Werte der Kontrolle I repräsentieren Poly(A)-Sequenzen, die aber nicht notwendigerweise zu RNA-Molekülen mit Globin codierenden Sequenzen gehören müssen. Diese Poly(A)-Sequenzen konnten mit RNAase T₂ (Kontrolle II) degradiert werden (Abbildung 11).

Der Hybridisierungspeak der ³H-Adenosin markierten Kern-RNA in Abbildung 11 zeigt wiederum zwei Maxima und insgesamt eine höhere Radioaktivität als Abbildung 10b.

Zum Nachweis, daß die Poly(A)-Sequenzen und die Globin codierenden Sequenzen in einem Molekül vorliegen, wurde die ³H-Adenosin markierte Kern-RNA von fünf Formamid-Saccharose-Gradienten jeweils bei 9 S und 15 S (den Hybridisierungsmaxima) gepoolt und mit unmarkierter Globin-cDNA hybridisiert.

Die Hydroxylapatit Chromatographie bei 60°C stellt eine geeignete Methode zur Abtrennung von DNA-DNA Hybriden von einzelsträngiger DNA dar (R.J. Britten et al.⁵⁰). Die Trennung von RNA-DNA Hybriden und einzelsträngiger RNA erwies sich jedoch als unzureichend. In Vorversuchen stellte sich nämlich heraus, daß die Fraktionen, die bei 60°C mit 0,5 M Na-phosphat eluiert wurden und nur reine Hybride enthalten sollten, stets mit nichthybridisierter Kern-RNA verunreinigt waren. Die Hybridfraktionen waren aber nicht mehr verunreinigt, wenn die nichthybridisierte RNA vorher enzymatisch degradiert worden war.

Die Hybridisierungsansätze der 9 S und 15 S Kern-RNA wurden deshalb mit RNAase A und RNAase T₁ inkubiert, anschließend auf die auf 60°C temperierte Hydroxylapatit Säule aufgetragen und mit 0,5 M Na-phosphat eluiert. Abbildung 12 zeigt die Verteilung der Radioaktivität der eluierten Fraktionen.

Das erste breite Maximum wurde von der enzymatisch degradierten RNA verursacht und das zweite von den Hybriden. Die Kontrolle, in der ³H-Adenosin markierte Kern-RNA aus den Fraktionen zwischen 9 S und 15 S enzymatisch degradiert wurde, zeigt in den Hybridfraktionen keine

Radioaktivität. Die Hybride enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, über Sephadex G 25 entsalzt und lyophilisiert.

4. 6. 2 Auftrennung der Poly(A)-Sequenzen im Gradienten

Das Material beider Pools wurde zum Schmelzen der Hybride bei 95°C 3 min inkubiert, schnell abgekühlt und - mit Ausnahme eines Aliquots (Kontrolle I) - mit DNAase I, RNAase A und RNAase T₁ inkubiert. Dadurch wurden die Nukleinsäuren bis auf Poly(A)-Sequenzen abgebaut. Ein zweites Aliquot (Kontrolle II) wurde zusätzlich mit RNAase T₂ degradiert. Jeweils vergleichbare Mengen der Proben aus dem 9 S und 15 S Pool wurden durch Saccharose-Gradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Abbildung 13 zeigt die Radioaktivitätsverteilung der Poly(A)-Sequenzen der neusynthetisierten Globin codierenden 9 S und 15 S Kern-RNA sowie die der entsprechenden Kontrollen. In Parallel-Gradienten wurden zur Bestimmung der Sedimentationswerte 4 S, 5 S und 9 S RNA als Markersubstanzen zentrifugiert.

Aus der Abbildung geht hervor, daß die Poly(A)-Sequenzen der 9 S wie der 15 S ³H-Adenosin markierten Kern-RNA mit Globin codierenden Sequenzen zwischen 4 S und 5 S sedimentieren. Daß es sich tatsächlich um Poly(A)-Sequenzen handelt, wird dadurch bewiesen, daß RNAase T₂ die Sequenzen degradiert. Die Werte der Kontrolle I zeigen, daß die nichtdegradierte RNA bei Sedimentationswerten von 9 S oder höher sedimentiert. Letzteres kann auf einer Aggregation der Moleküle beruhen.

Die Möglichkeit, daß die Poly(A)-Sequenzen der 15 S Kern-RNA auf eine Kontamination mit Poly(A)-Sequenzen aus der 9 S Kern-RNA zurückzuführen sind, kann ausgeschlossen werden. In diesem Falle sollte man annehmen, daß der Poly(A)-Peak der 9 S Kern-RNA größer ist. Tatsächlich ist aber der Poly(A)-Peak der 15 S Kern-RNA etwas höher.

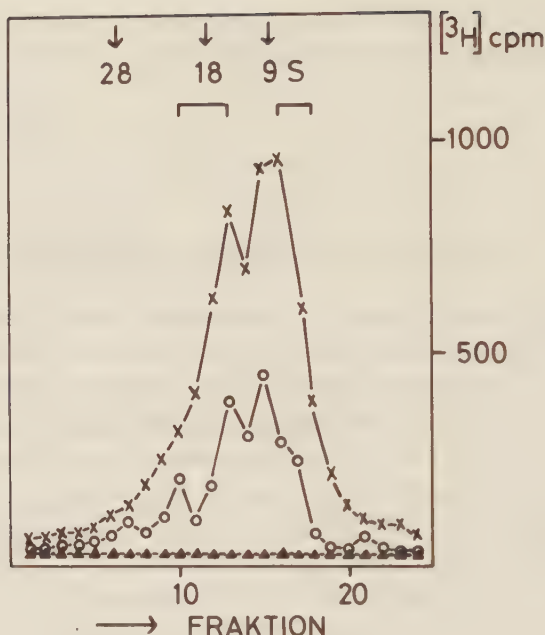


Abb. 11: Hybridisierung von ^3H -Adenosin markierter Poly(A) $^+$ Kern-RNA nach Fraktionierung in Formamid-Saccharose - Gradienten

500 μg ^3H -Adenosin markierte Kern-RNA wurden in 500 μl Puffer 14 aufgenommen und in einem 4,6 - 22 % Formamid-Saccharose-Gradienten im Spinco SW 41 Rotor bei 25°C und 39 000 rpm 40 Stunden zentrifugiert. 33,3 % der konzentrierten Fraktionen wurden mit 400 ng unmarkierter Globin-cDNA (-x-x-) und zwei Kontrollen ohne cDNA inkubiert. Die Ansätze wurden zum Abbau der nichthybridisierten Nukleinsäuren mit RNAase A und RNAase T₁ inkubiert (Kontrolle I: (-o-o-)), Kontrolle II außerdem mit RNAase T₂ (-▲-▲-). Die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials wurden bestimmt.

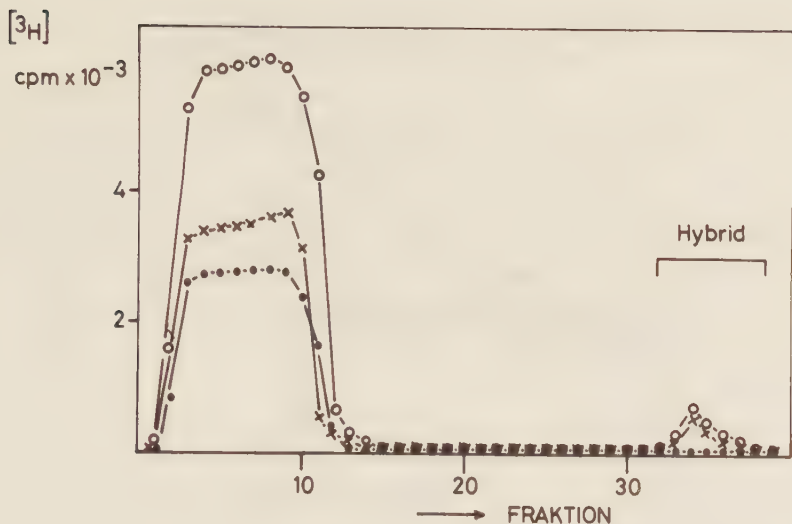


Abb. 12: Hydroxylapatit Chromatographie

Die durch die Klammern in Abb.11 gekennzeichneten Fraktionen der ^3H -Adenosin markierten Kern-RNA bei 9 S (-x-x-) und 15 S (-o-o-) sowie die dazwischen liegenden Fraktionen (-●-●-) wurden von fünf Gradienten gepoolt. Nach Hybridisierung der 9 S und 15 S Kern-RNA mit einem Überschuß an unmarkierter Globin-cDNA wurden alle drei Pools mit RNAase A und RNAase T_1 zum Abbau der nichthybridisierten Nukleinsäuren inkubiert. Die Ansätze wurden 0,12 M an Na-phosphat (pH 6,8) gemacht und jeweils auf eine Hydroxylapatit (DNA grade, Bio-Gel HTP, Bio-Rad) Säule (3 x 1 cm) bei 60°C aufgetragen. Während die degradierten Nukleinsäuren (erster Peak) nicht an die Säule gebunden wurden, konnten die reinen Hybride (zweiter Peak) mit 0,5 M Na-phosphat eluiert werden.

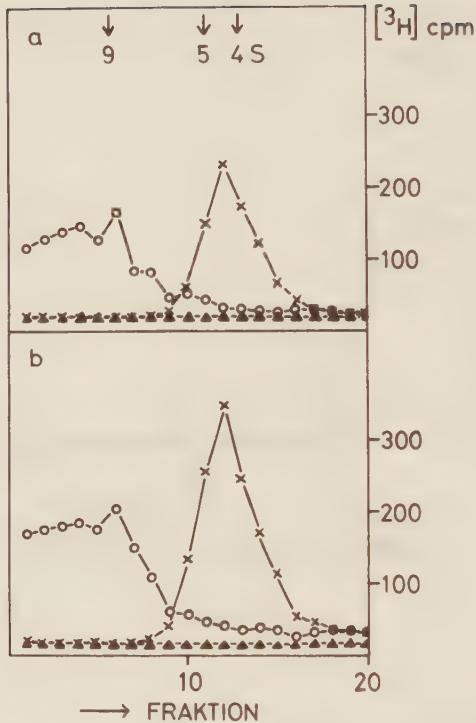


Abb. 13: Gradientenzentrifugation der Poly(A)-Sequenzen

Die in Abb. 12 gekennzeichneten Hybride enthaltenden Fraktionen der (a) 9 S und (b) 15 S ^3H -Adenosin markierten Kern-RNA wurden gepoolt. Die DNA-RNA Hybride wurden auf 95°C erhitzt und schnell abgekühlt. Aliquots wurden entnommen (Kontrolle I: -o-o-); das restliche Material wurde mit DNAase I, RNAase A und RNAase T_1 inkubiert (-x-x-). Danach wurde ein zweites Aliquot (Kontrolle II: -▲-▲-) zusätzlich mit RNAase T_2 inkubiert. Alle Proben wurden jeweils in einem 15 - 30 % Saccharose-Gradienten in Puffer 10 im Spinco SW 65 Rotor bei 0°C und 60 000 rpm 15 Stunden zentrifugiert. Die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials wurden gemessen.

4.7 Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in Poly(A)⁺ und Poly(A)⁻ steady state Kern-RNA

Zur Auftrennung der steady state Kern-RNA in Poly(A)⁺ und Poly(A)⁻ Kern-RNA wurden jeweils 4 mg auf eine Poly(U)-Sephrose Säule aufgetragen und mit den formamidhaltigen Puffern 6 bis 8 eluiert. Während 98 % des Materials nicht an die Säule gebunden werden konnten - dabei handelt es sich um die Poly(A)⁻ Kern-RNA -, betrug die Ausbeute an Poly(A)⁺ Kern-RNA durchschnittlich 2 %. Weniger als 0,2 % der auf die Säule geladenen RNA wurde in der Zwischenfraktion mit Puffer 7 eluiert.

4.7.1 Bestimmung der $c_{ro} \cdot t$ -Werte

Zur Bestimmung des Gehalts an Globin codierenden Sequenzen in poly-somaler RNA und in steady state Kern-RNA, die durch Poly(U)-Sephrose Chromatographie in Poly(A)⁺ und Poly(A)⁻ RNA aufgetrennt worden war, wurden diese RNA-Fractionen mit ³H-markierter Globin-cDNA hybridisiert. Die Hybridisierungsreaktionen wurden in 10 · 20fachen Ansätzen durchgeführt, aus denen Aliquots zu bestimmten $c_{ro} \cdot t$ -Werten (RNA-Konzentration c_{ro} x Hybridisierungszeit t) entnommen wurden. Hybridisierungsreaktionen, bei denen die $c_{ro} \cdot t$ -Werte gemessen werden, bieten die Möglichkeit, den Gehalt bestimmter Protein codierender Sequenzen in verschiedenen RNA-Fractionen exakt zu ermitteln. Im Gegensatz zur Sättigungshybridisierung, wo der Hybridisierungsgrad nur in Abhängigkeit von ansteigenden RNA-Mengen gemessen wird, gehen bei der Bestimmung der $c_{ro} \cdot t$ -Werte sowohl die RNA-Konzentration als auch die Hybridisierungszeit ein.

Indem der Gehalt an Globin codierenden Sequenzen der 9 S Globin-mRNA auf 100 % festgelegt und die Kinetik dieser Hybridisierungsreaktion als Standard für die anderen Reaktionen gewertet wurde, konnte das Hybridisierungsvermögen der anderen RNA-Spezies bestimmt werden.

Abbildung 14 zeigt die Kinetik der Hybridisierungen von 9 S Globin-mRNA, polysomaler RNA, unfraktionierter steady state Kern-RNA sowie den Poly(A)⁺ und Poly(A)⁻ Kern-RNA-Fraktionen, die durch Poly(U)-Sephadex Chromatographie aufgetrennt wurden. Den Kurven kann entnommen werden, daß alle RNA-Spezies der unreifen roten Blutzellen vollständig mit Globin-cDNA hybridisieren wie 9 S Globin-mRNA als Template der cDNA. Das heißt, daß Globin codierende Sequenzen in allen RNA-Fraktionen vorhanden sind, jedoch auf Grund der Verschiebung der Kurven in Richtung der Abszisse mit abnehmender Konzentration.

Der Gehalt an Globin codierenden Sequenzen der verschiedenen RNA-Spezies kann durch Ermittlung des $c_{ro}t_{1/2}$ -Wertes - definiert als der $c_{ro}t$ -Wert, bei dem 50 % der vorgegebenen cDNA mit der RNA hybridisieren - bestimmt werden. Dazu wurden die $c_{ro}t_{1/2}$ -Werte mit dem für 9 S Globin-mRNA, der bei 3×10^{-3} Mol x sec/l liegt, verglichen. Tabelle 6 zeigt neben den $c_{ro}t_{1/2}$ -Werten die daraus bestimmten Werte für den Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in den verschiedenen RNA-Fraktionen.

Tabelle 6

RNA-Fraktion	$c_{ro}t_{1/2}$ (Mol x sec/l)	Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in %
steady state Kern-RNA	$3,5 \times 10^{-1}$	0,86
Poly(A) ⁺ Kern-RNA	$1,5 \times 10^{-2}$	20,0
Poly(A) ⁻ Kern-RNA	$7,2 \times 10^{-1}$	0,42
Polysomale RNA	$3,0 \times 10^{-1}$	1,0
9 S Globin-mRNA	$3,0 \times 10^{-3}$	100,0

Der für polysomale RNA ermittelte Gehalt von 1 % stimmt gut mit dem bei der Sättigungshybridisierung bestimmten Wert von 0,94 % überein (siehe Kapitel 4.3.2).

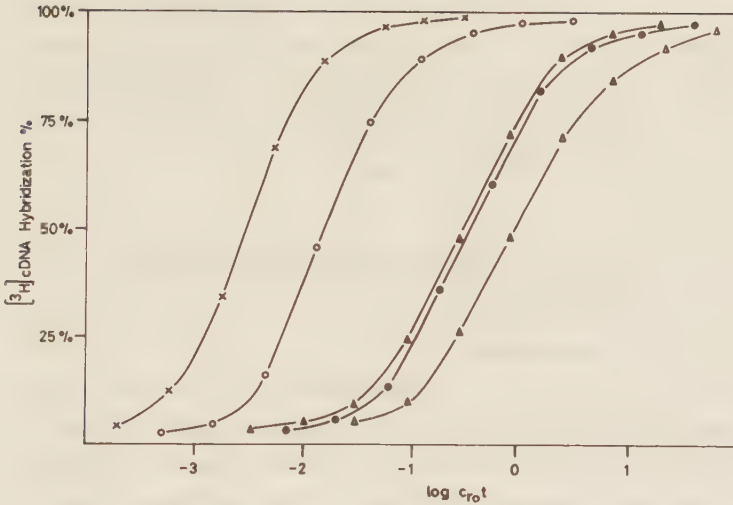


Abb. 14: Hybridisierung von ^3H -markierter Globin-cDNA in Abhängigkeit von der RNA-Konzentration (c_{ro}) und der Hybridisierungszeit (t)

In 10 - 20 fachen Hybridisierungsansätzen wurden 9 S Globin-mRNA (-x-x-), polysomale RNA (-▲-▲-), unfractionierte Kern-RNA (-●-●-), Poly(A)⁺ Kern-RNA (-o-o-) und Poly(A)⁻ Kern-RNA (-Δ-Δ-) gegen ^3H -markierte Globin-cDNA (jeweils 1 000 cpm pro Einfachansatz) hybridisiert.

Aliquots von 15 μl wurden zu den jeweiligen $c_{ro} \cdot t$ -Werten entnommen. Nach dem Abbau der nichthybridisierten Nukleinsäuren mit Nuklease S_1 wurden die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials gemessen. Daraus wurde der Anteil in % der hybridisierten ^3H -markierten Globin-cDNA bestimmt.

Aus dem Anteil der Poly(A)⁺ Kern-RNA in der steady state Kern-RNA, der durchschnittlich bei 2 % lag, und dem Gehalt an Globin codierenden Sequenzen läßt sich berechnen, daß weniger als 50 % dieser Sequenzen in der Poly(A)⁺ Kern-RNA enthalten sind; mehr als 50 % sind in der Poly(A)⁻ Kern-RNA enthalten.

4.7.2 Translation der RNA im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen

4.7.2.1 Proteinbiosynthese

Zur weiteren Untersuchung der Globin codierenden Sequenzen wurden alle RNA-Fractionen aus unreifen roten Hühnerblutzellen, die in Kapitel 4.7.1 gegen Globin-cDNA hybridisiert worden waren, im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen in Gegenwart einer ribosomalen Waschfraktion (siehe Kapitel 4.3.3.1) translatiert (M. Mathews und A. Korner⁵², W. Knöchel et al.⁵³).

Die Proteinbiosynthese wurde mit EDTA gestoppt und zur Messung des ³H-Leucin Einbaus ein Aliquot der fünffachen Ansätze entnommen. Nach KOH-Hydrolyse wurde die Radioaktivität der in vitro synthetisierten Proteine bestimmt und die durch die verschiedenen RNA-Spezies hervorgerufene Stimulation der Proteinbiosynthese errechnet (Tabelle 7).

Tabelle 7

RNA-Fraktion	Gesamteinbau an ³ H-Leucin (cpm)	Stimulation in %
steady state Kern-RNA	134 600	405
Poly(A) ⁺ Kern-RNA	230 275	764
Poly(A) ⁻ Kern-RNA	101 010	279
Polysomale RNA	212 295	697
9 S Globin-mRNA	233 695	777
H ₂ O	26 630	---

4.7.2.2 Produktanalyse

Zur Analyse des Anteils an Globinketten der durch die RNA-Spezies synthetisierten Proteine wurden die Ansätze mit unmarkierten Globinketten versetzt. Das Material wurde über eine Sephadex G 100 Säule aufgetrennt (siehe Abbildung 6a) und die Globinketten enthaltenden Fraktionen vereinigt. Die Proteine wurden nach Dialyse über eine Carboxymethylcellulose Säule (CM 52) in α^A -, α^D - und ein Gemisch aus β^A - und β^D -Globinketten aufgetrennt (A. G. Stewart et al. ⁶²). Abbildung 15 zeigt das Extinktionsprofil der zugesetzten, unmarkierten Globinketten bei 280 nm und die Radioaktivität der ³H-markierten Proteine, die im zellfreien System ohne RNA und in Gegenwart von 9 S Globin-mRNA, unfraktionierter Kern-RNA und Poly(A)⁺ Kern-RNA synthetisiert wurden. (Die Profile für polysomale RNA und Poly(A)⁻ RNA sind in den Abbildungen nicht dargestellt)

Die Globin codierende Aktivität aller RNA-Spezies wurde aus der Summe der Impulse unter den Peaks der Globinketten (Fraktionen 24-38 und 52-64) durch Division mit der Zahl der Impulse des ³H-Leucin Gesamteinbaus, der in Tabelle 7 aufgeführt wurde, bestimmt (Tabelle 8).

Tabelle 8

RNA-Fraktion	cpm ³ H-Leucin in Fraktion 24-38 und 52-64 ⁺⁾	cpm ³ H-Leucin in Fraktion 24-38 und 52-64 ⁺⁾
		Gesamteinbau an ³ H-Leucin (cpm) (Tabelle 7)
steady state Kern-RNA	35 218	21,9 %
Poly(A) ⁺ Kern-RNA	157 809	71,8 %
Poly(A) ⁻ Kern-RNA	17 159	7,5 %
Polysomale RNA	139 068	68,6 %
9 S Globin-mRNA	167 218	75,2 %
H ₂ O	11 552	---

^{+) Bei der Berechnung dieser Werte wurde neben den Fraktionsvolumina berücksichtigt, daß nur 60% der Globinketten unter Standard bedingungen von den Carboxymethylcellulose Säulen eluiert werden können. Außerdem wurde die unterschiedliche Ausbeute bei der Radioaktivitätsbestimmung der Proben nach TCA Fällung und bei Direktmessung in wässriger Lösung berücksichtigt.}

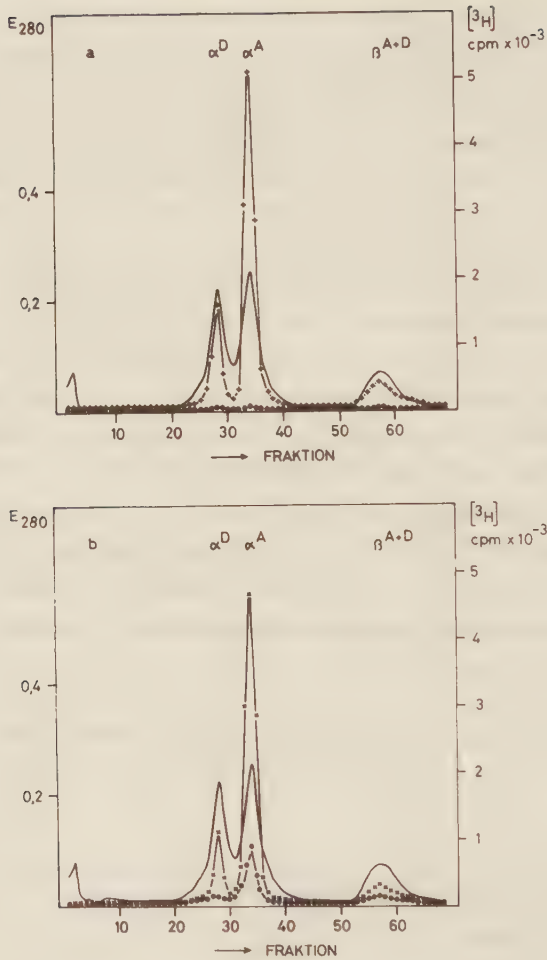


Abb. 15: Carboxymethylcellulose Chromatographie

Die durch die Klammer in Abb. 6a gekennzeichneten Fraktionen (die Globinketten) wurden gepoolt und gegen Puffer 32 dialysiert. Die Globinketten wurden durch einen linearen Gradienten (50 ml Puffer 32 als Startpuffer, 50 ml Puffer 33 als Endpuffer) aufgetrennt und eluiert. Extinktion des Eluats bei 280 nm (———), cpm durch den Einbau von ³H-Leucin in Gegenwart von a) (-●-●-) keine RNA, (-+ -+) 9 S Globin-mRNA, b) (-o-o-) unfractionierte Kern-RNA, (-x-x-) Poly(A)⁺ Kern-RNA.

Die Produktanalyse der in vitro synthetisierten Proteine ergab, daß bei Translation der steady state Kern-RNA etwa 20 % der synthetisierten Proteine auf Globinketten zurückzuführen sind. Während die Globin codierende Aktivität von 9 S Globin-mRNA etwa 75 % beträgt, liegt der Wert für Poly(A)⁺ Kern-RNA in der gleichen Größenordnung wie für polysomale RNA (etwa 70 %).

4.8 Gehalt an Protein codierenden Sequenzen, die in Leberzellen und unreifen roten Blutzellen vorkommen

In Kapitel 4.7 wurde der Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in RNA-Spezies aus unreifen roten Blutzellen untersucht. Es wurde auf Grund der Hybridisierungsexperimente festgestellt, daß die Poly(A)⁻ Kern-RNA nur 0,42 % und die Poly(A)⁺ Kern-RNA 20 % Globin codierende Sequenzen enthält. Die Funktion der übrigen Sequenzen blieb unbekannt.

Eine weitere Untersuchung sollte zeigen, ob diese Sequenzen andere Proteine codieren, z.B. solche, die sowohl in der Leber und in unreifen roten Blutzellen synthetisiert werden und ob sie in der Poly(A)⁻ Fraktion angereichert sind.

Für diesen Versuch wurde Poly(A)-haltige mRNA aus der polysomalen RNA von Hühnerleberzellen durch Chromatographie an Oligo(dT)-Cellulose isoliert. Mit der "Leberprotein-mRNA" als Template wurde eine ³H-markierte "Leberprotein-cDNA" hergestellt. Die Hybridisierungsreaktionen der "Leberprotein-cDNA" mit der Template-RNA und den RNA-Spezies aus den unreifen roten Blutzellen zeigt Abbildung 16.

Zur Kontrolle wurde Hefe-tRNA ebenfalls hybridisiert. Dabei ergaben sich keine meßbaren Radioaktivitäten, so daß eine artifizielle Hybridisierung in den Versuchen ausgeschlossen werden konnte.

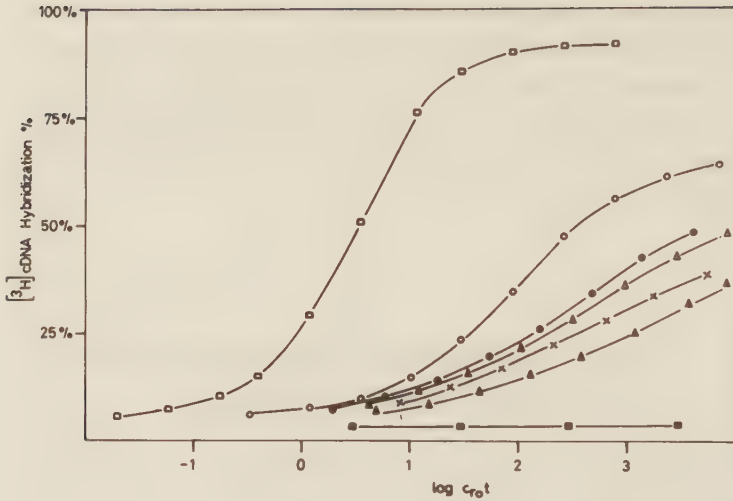


Abb. 16: Hybridisierung von ^3H -markierter "Leberprotein-cDNA" in Abhängigkeit von der RNA-Konzentration (c_{ro}) und der Hybridisierungszeit (t)

In 10-20fachen Hybridisierungsansätzen wurden polysomale, Poly(A)-haltige RNA aus Hühnerleberzellen (-□ - □ -), 9 S Globin-mRNA (-x-x-), polysomale RNA (-▲ - ▲ -), unfractionierte Kern-RNA (-● - ● -), Poly(A)⁺ Kern-RNA (-○-○-) und Poly(A)⁻ Kern-RNA (-△ - △ -) sowie Hefe-tRNA (-■ - ■ -) gegen ^3H -markierte "Leberprotein-cDNA" (jeweils 1 000 cpm pro Einfachansatz) hybridisiert. Aliquots von 15 μl wurden zu den jeweiligen $c_{ro}t$ -Werten entnommen. Nach dem Abbau der nichthybridisierten Nukleinsäuren mit Nuklease S_1 wurden die Radioaktivitäten des TCA fällbaren Materials gemessen. Daraus wurde der Anteil in % der hybridisierten ^3H -markierten "Leberprotein-cDNA" bestimmt.

Der $c_{ro} t_{1/2}$ -Wert für "Leberprotein-mRNA" betrug $3,5 \times 10^0$ Mol x sec/l, dagegen lag der $c_{ro} t_{1/2}$ -Wert bei der Hybridisierung von Globin-mRNA/Globin-cDNA bei 3×10^{-3} Mol x sec/l. Das bedeutet, daß die Sequenzkomplexität - definiert als die Summe der Molekulargewichte aller verschiedenen RNA-Spezies - in den Leberzellen über 1000 mal größer ist als in den unreifen roten Blutzellen. Außerdem erstreckte sich die Hybridisierungsreaktion über 4 - 4,5 log Einheiten (bei Globin-mRNA über 2 - 2,5 log Einheiten), was auf zahlreiche "frequency classes" (Häufigkeitsklassen) in der "Leberprotein-mRNA" schließen läßt.

Mit den RNA-Spezies der unreifen roten Blutzellen konnte keine vollständige (100 %) Hybridisierung der "Leberprotein-cDNA" erreicht werden, obwohl die Hybridisierungszeit auf 2 Monate ausgedehnt wurde. Auf Grund des vorliegenden Kurvenverlaufs ist jedoch anzunehmen, daß die Reaktionen bei noch längerer Hybridisierungszeit zwischen 50 - 70 % in eine Sättigungsphase übergehen. Daraus kann geschlossen werden, daß ca. 50-70 % der RNA-Sequenzen, die in der Leber vorkommen, zu einem geringen Prozentsatz in unreifen roten Blutzellen vorhanden sind. Wegen der unvollständigen Hybridisierungsreaktionen konnten $c_{ro} t_{1/2}$ -Werte nur ungefähr geschätzt werden. Tabelle 9 zeigt die geschätzten $c_{ro} t_{1/2}$ -Werte und die daraus bestimmten Werte für den Gehalt an "Leberprotein" codierenden Sequenzen in den verschiedenen RNA-Fractionen.

Tabelle 9

RNA-Fraktion (nur aus unreifen roten Blutzellen)	$c_{ro} t_{1/2}$ (Mol x sec/l) (geschätzt)	Gehalt an "Leberprotein" codierenden Sequenzen in %
steady state Kern-RNA	$5,3 \times 10^2$	0,7
Poly(A) ⁺ Kern-RNA	1×10^2	3,5
Poly(A) ⁻ Kern-RNA	$5,5 \times 10^2$	0,64
Polysomale RNA	2×10^3	0,18
9 S Globin-mRNA	$6,4 \times 10^2$	0,55

Aus den Werten der Tabelle und aus der Verschiebung der Hybridisierungskurven ist klar ersichtlich, daß der prozentuale Gehalt an gemeinsamen Sequenzen in den RNA-Fraktionen der unreifen roten Blutzellen in folgender Reihe abnimmt: Poly(A)⁺ Kern-RNA/Kern-RNA/Poly(A)⁻ Kern-RNA/9 S Globin-mRNA/polysomale RNA. Der Gehalt an diesen Sequenzen in der hochgereinigten 9 S Globin-mRNA ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß 9 S Globin-mRNA in sehr geringem Umfang noch andere RNA-Sequenzen enthält.

Aus den unterschiedlichen Steigungen der Hybridisierungskurven geht hervor, daß sich die Verteilung der "frequency classes" in der RNA, die sowohl in den Leber- als auch in den Blutzellen vorkommt, in den RNA-Fraktionen der unreifen roten Blutzellen von der Verteilung, wie sie in der "Leberprotein-mRNA" vorliegt, unterscheidet.

5. DISKUSSION

Kern-RNA wurde durch Phenolextraktion aus Zellkernen von unreifen roten Blutzellen aus Hühnern isoliert. Diese Kern-RNA besteht aus allen RNA-Spezies des Zellkerns im Gleichgewicht von Synthese und Abbau. Als sogenannte steady state RNA muß sie von der kleinen Fraktion der neusynthetisierten RNA des Zellkerns unterschieden werden.

Zur Untersuchung der Größenverteilung der Globin codierenden Sequenzen und der Poly(A)-Sequenzen in steady state Kern-RNA und in polysomaler RNA wurde die RNA in Saccharose-Gradienten und exponentiellen Polyacrylamid-Gelen mit Formamid als Lösungsmittel aufgetrennt. Formamid wirkt auf Nukleinsäuren denaturierend, indem es inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen verhindert und dadurch die Tertiärstruktur der Kern-RNA zerstört (G. Spohr et al.⁴⁵).

Durch Verwendung dieses Lösungsmittels sollte die Bildung von artifizialen Aggregaten während der Auftrennung der RNA weitgehend vermieden werden.

Globin-cDNA, die durch die "Reverse Transkriptase" komplementär zu 9 S Globin-mRNA als Template in vitro synthetisiert wurde, diente zur Hybridbildung von Globin codierenden Sequenzen in der zu untersuchenden RNA. Die Sedimentationswerte der durch die Gradientenzentrifugation aufgetrennten und danach hybridisierten, Globin codierenden Sequenzen konnten nach Abbau der einzelsträngigen, nichthybridisierten Nukleinsäuren durch Radioaktivitätsmessung ermittelt werden.

Die Hybridisierungsexperimente mit ³H-markierter Globin-cDNA und ³H-markiertem Poly(U) zeigten, daß Globin codierende steady state RNA im Zellkern wie auch im Cytoplasma bei 9 S sedimentieren und daß auch Poly(A)-Sequenzen in beiden RNA-Spezies in Molekülen dieser Größenordnung vorkommen. Dieser Sedimentationswert entspricht dem von cytoplasmatischer Globin-mRNA.

Obwohl im Bereich höherer Sedimentationswerte kein definierter Radioaktivitätspeak zu erkennen war, konnte jedoch durch Sättigungshybridisierung von Kern-RNA I (< 20 S) und Kern-RNA II (> 20 S) gezeigt werden, daß etwa 0,3 % der Globin codierenden Kern-RNA auf Moleküle mit Sedimentationswerten größer als 20 S zurückzuführen waren.

Untersuchungen, bei denen ^{125}J markierte Globin-mRNA hoher spezifischer Radioaktivität zusammen mit Kern-RNA in Formamid-Saccharose-Gradienten zentrifugiert wurde, ergaben jedoch, daß 0,2 - 0,4 % der ^{125}J -markierten Globin-mRNA ebenfalls in Pool II (> 20 S) sedimentierten. Es ist daher wahrscheinlich, daß der geringe Prozentsatz Globin codierender Sequenzen in der Kern-RNA II auf eine Kontamination der hochmolekularen RNA mit kleineren 9 S mRNA-Molekülen zurückzuführen ist. Schließlich ergab auch die Produktanalyse der im Ehrlich Ascites System durch Kern-RNA I und Kern-RNA II synthetisierten Proteine, daß nur in Pool I der steady state Kern-RNA Globin codierende Sequenzen enthalten sind.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich der Größenverteilung von Globin codierenden Sequenzen in steady state Kern-RNA und polysomaler RNA stehen im Einklang zu den Untersuchungen mit unreifen roten Blutzellen von Enten (Spohr et al. ⁶³); jedoch konnte keine Globin codierende RNA in der steady state RNA mit einem Sedimentationswert von 14 S gefunden werden, wie sie von M. MacNaughton et al. ⁶⁴ beschrieben wurde. Weiterhin standen die Resultate der vorliegenden Untersuchung im Widerspruch zu den Ergebnissen früherer Arbeiten anderer Autoren, die Kern-RNA aus erythropoetischen Geweben in Dimethylsulfoxid-Gradienten aufgetrennt und sie dann translatiert oder mit Globin-cDNA hybridisiert hatten. In diesen Arbeiten wurden höhermolekulare Precursor-Moleküle für Globin-mRNA gefunden (T. Imaizumi et al. ¹⁸, A. Ruiz-Carillo et al. ¹⁹, R. Williamson et al. ²⁰, W. Knöchel und H. Tiedemann ²⁴).

Es erhebt sich daher die Frage, ob es in Formamid zu Brüchen größerer RNA-Moleküle kommt oder aber zu Aggregationen in Dimethylsulfoxid.

Gegen einen Abbau spricht die Beobachtung, daß die ribosomale RNA nach Zentrifugation in Formamid unversehrt bleibt. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß in Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel Wechselwirkungen zwischen den RNA-Molekülen (eventuell unter Vermittlung des Lösungsmittels) stattfinden. Diese Vermutung wurde inzwischen von anderen Autoren experimentell bestätigt (S.R. de Kloet et al.²⁵, J.A. Maxwell²⁶). Die Globin codierenden Sequenzen in steady state Kern-RNA unterscheiden sich somit in ihren Sedimentationseigenschaften nicht von cytoplasmatischer 9 S Globin-mRNA.

Dieser Befund schließt jedoch nicht die Möglichkeit aus, daß die Fraktion der primären Transcriptionsprodukte (neusynthetisierte RNA) dennoch höhermolekulare Globin codierende RNA-Moleküle enthält, die in sehr geringen Mengen vorkommen und/oder sehr kurze Halbwertszeiten aufweisen. Um diese neusynthetisierte Kern-RNA kenntlich zu machen und sie von anderen RNA-Spezies des Zellkerns unterscheiden zu können, wurden die unreifen roten Blutzellen mit ³H-Uridin 15 min pulsmarkiert. Die Verteilung der Globin codierenden Sequenzen in dieser neusynthetisierten, pulsmarkierten Kern-RNA wurde wieder durch Hybridisierung mit Globin-cDNA, die jedoch bei diesen Experimenten unmarkiert sein mußte, untersucht.

Dabei konnte festgestellt werden, daß in der neusynthetisierten Kern-RNA aus unreifen roten Hühnerblutzellen höhermolekulare, Globin codierende RNA-Sequenzen existieren, die in Formamid-Saccharose-Gradienten ungefähr bei 15 S sedimentieren. Die Existenz dieser 15 S RNA konnte kürzlich auch in fetalen Mäuseleberzellen, in kernhaltigen erythroiden Zellen anämischer Mäuse und in Dimethylsulfoxid induzierten Friend Zellen nachgewiesen werden (J. Ross⁴⁹, P.J. Curtis und C. Weissmann⁶⁵, S.P. Kwan et al.⁶⁶, R.N. Bastos und H. Aviv⁶⁷).

Da die 15 S RNA mit Globin codierenden Sequenzen größer ist als cytoplasmatische 9 S Globin-mRNA, ist es wahrscheinlich, daß sie den natürlichen Precursor von Globin-mRNA darstellt. Dies wird weiter un-

terstützt durch die Beobachtungen, daß nach längerer Markierungszeit der 15 S Peak relativ zu dem ansteigenden 9 S Peak kleiner wird (R. N. Bastos und H. Aviv⁶⁷, P. J. Curtis et al.⁶⁸ und eigene Beobachtungen).

Andererseits kann man nicht vollständig ausschließen, daß die 15 S RNA durch weniger häufige Initiation von einer Stelle aus gebildet wird, die von der Terminationsstelle weiter entfernt liegt. In diesem Fall würde die 15 S RNA ein zusätzliches Transcriptionsprodukt mit Globin codierenden Sequenzen darstellen, das entweder zu 9 S RNA umgewandelt oder schnell vollständig abgebaut werden kann. In jedem Fall sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu beweisen, daß die gesamte 9 S RNA aus dem 15 S Precursor besteht. Der Nachweis über die Existenz größerer Precursor für spezifische mRNA-Moleküle ist von großer Bedeutung für das Verständnis der Genom-Organisation in Eukaryontenzellen.

Die Menge des mutmaßlichen Precursors in der neusynthetisierten Kern-RNA ist sehr gering (0,07 % gemessen an cpm in Hybriden).

Zusammen mit der pulsmarkierten, Globin codierenden 9 S Kern-RNA (0,15 %) ergibt sich ein Anteil von 0,2 - 0,3 % an Globin codierenden Sequenzen in der gesamten, neusynthetisierten Kern-RNA. Diese Angaben stimmen mit denen von Kwan et al.⁶⁶ gut überein, die 0,4 % einer 10 min pulsmarkierten RNA von kernhaltigen, erythroiden Mäusezellen an eine Globin-cDNA-Cellulose Säule binden konnten.

Der Anteil des Precursors an der gesamten Kern-RNA ist sehr viel geringer. Unter der Voraussetzung, daß 0,86 % der gesamten Kern-RNA Globin codierende Sequenzen enthalten, kann aus den Versuchen mit der steady state Kern-RNA (siehe Abbildung 9b) auf einen Anteil des mutmaßlichen Precursors von weniger als 0,01 % in der gesamten Kern-RNA geschlossen werden.

Zur Untersuchung, ob der mutmaßliche 15 S RNA-Precursor Poly(A)-Sequenzen enthält, wurde die ³H-Uridin pulsmarkierte Kern-RNA an einer Poly(U)-Sephrose Säule chromatographiert und in Poly(A)⁺ und

Poly(A)⁻ Kern-RNA aufgetrennt. 20 % der radioaktiven RNA entfielen auf die Poly(A)⁺ Fraktion. Die Hybridisierung der fraktionierten Poly(A)⁺ Kern-RNA mit Globin-cDNA ergab, daß Poly(A)-Sequenzen auch in der Globin codierenden 15 S Kern-RNA vorkommen. Die Radioaktivitätsverteilung der hybridisierten Poly(A)⁺ Kern-RNA zeigte im Vergleich zur unfractionierten, neusynthetisierten Kern-RNA, daß nahezu 50 % aller Globin codierenden Sequenzen in der Poly(A)⁺ Fraktion enthalten waren.

Zur Analyse der Poly(A)-Sequenzen in Globin codierenden RNA-Molekülen wurde Kern-RNA mit ³H-Adenosin markiert und auf Formamid-Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Die Hybridisierungsreaktionen mit unmarkierter Globin-cDNA ergaben nach Abbau mit RNAase A und RNAase T₁ wiederum Maxima bei 9 S und bei 15 S. Kontrollversuche, bei denen nichthybridisierte RNA mit RNAase A und RNAase T₁ behandelt wurde, führten zu keinem vollständigen Abbau. Die verbleibende Aktivität ist auf Poly(A)-Sequenzen zurückzuführen, die jedoch nicht notwendigerweise zu Molekülen mit Globin codierenden Sequenzen gehören müssen.

Die Poly(A)-Sequenzen konnten mit RNAase T₂ völlig abgebaut werden. Während RNAase A Nukleotidketten speziell neben Pyrimidinen und RNAase T₁ speziell neben Guanosin spaltet, greift RNAase T₂ überwiegend Adenylsäurebindungen an.

Zur Untersuchung, ob die Poly(A)-Sequenzen tatsächlich zu Globin codierenden RNA-Molekülen gehören, wurden 9 S und 15 S RNA aus mehreren Gradienten gepoolt und mit Globin-cDNA hybridisiert.

Die Hybride wurden nach RNAase-Abbau von nichthybridisierter RNA durch Hydroxylapatit Chromatographie abgetrennt. Die Globin codierenden Sequenzen innerhalb der Hybride wurden schließlich mit DNAase I, RNAase A und RNAase T₁ abgebaut. Nach Gradientenzentrifugation des verbleibenden Materials, das Poly(A)-Sequenzen darstellt, wurden sowohl für die 9 S wie auch für die 15 S RNA Poly(A)-Sequenzen mit Sedimentationswerten zwischen 4 S und 5 S gefunden.

Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, daß zumindest ein

Teil der bei 15 S sedimentierenden Globin-mRNA Precursor bereits eine Poly(A)-Sequenz besitzt und daß die posttranscriptionelle Polyadenylierung (J.E.Darnell et al.⁶) ein frühzeitiges Ereignis des Processing ist.

Auf Grund der Tatsache, daß die Poly(A)-Sequenzen zusammen mit Globin codierenden Sequenzen (die wiederum mit cDNA hybridisiert waren) an Hydroxylapatit gebunden werden konnten, folgt, daß beide Sequenzen direkt nebeneinander liegen. Wäre dies nicht der Fall, so würde die Poly(A)-Sequenz von der Globin codierenden Sequenz durch Einwirkung von RNAase A und RNAase T₁ abgetrennt werden und von der Hydroxylapatit Säule mit dem degradierten Material eluiert werden.

Da die cDNA stets vom 3'-OH Ende der mRNA synthetisiert wird und wahrscheinlich keine vollständige Kopie darstellt, kann man weiter folgern, daß die Poly(A)-Sequenzen auch am 3'-OH Ende des mutmaßlichen Precursors liegen. Diese Feststellung bestätigen Ergebnisse anderer Autoren über die Position der Poly(A)-Sequenzen in HnRNA-Molekülen (C.R.Molloy et al.⁶⁹, R.Sheldon et al.⁷⁰). Weiterhin ergibt sich daraus die wichtige Feststellung, daß Globin-mRNA Sequenzen dann auch am 3'-OH Ende des Precursors plaziert sind.

Bei den Versuchen mit ³H-Adenosin markierter Kern-RNA fiel auf, daß die mit cDNA hybridisierte, unfractionierte Kern-RNA im Bereich zwischen 20 S und 28 S einen kleinen Radioaktivitätspeak aufwies, der bei Hybridisierung mit Poly(A)⁺ Kern-RNA nicht mehr meßbar war.

In jüngster Zeit haben Untersuchungen von R.N.Bastos und H.Aviv⁶⁷ über Globin codierende Kern-RNA in Dimethylsulfoxid induzierten Friend Zellen zu der Annahme geführt, daß neben Poly(A)-haltiger 9 S und 15 S RNA eine Poly(A)-freie 27 S RNA mit Globin codierenden Sequenzen existiert, die eine sehr kurze Halbwertszeit aufweist. Das würde bedeuten, daß die Polyadenylierung des Precursors während der Spaltung der 27 S RNA in die 15 S RNA stattfindet. Die Zahl der Impulse im Bereich von 27 S bei der Hybridisierung unfractionierter Kern-RNA ist in der vorliegenden Arbeit ebenso wie in der Arbeit von R.N.Bastos und H.Aviv⁶⁷ sehr niedrig (siehe Abbildung 10). Doch könnte

die Existenz eines bei 27 S sedimentierenden Poly(A)-freien Precursors auch aus diesem Versuch abgeleitet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Polyadenylierung der RNA bei der Selektion zu translatierender Sequenzen von Transcriptionsprodukten im Kern eine Bedeutung hat.

Dazu wurde zunächst steady state Kern-RNA durch Poly(U)-Sephadex Chromatographie in eine Poly(A)⁺ und eine Poly(A)⁻ Fraktion aufgetrennt. Der Anteil der Poly(A)⁺ Kern-RNA in der steady state Kern-RNA betrug durchschnittlich 2 %. Im Unterschied dazu entfielen bei der pulsmarkierten, neusynthetisierten Kern-RNA etwa 20 % der Radioaktivität auf die Poly(A)⁺ Fraktion (siehe oben). Durch Hybridisierung mit ³H-markierter Globin-cDNA und Bestimmung von $c_{ro\frac{t}{2}}$ -Werten wurde der Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in den verschiedenen Kern-RNA Fraktionen und polysomaler RNA bestimmt.

Der für 9 S Globin-mRNA ermittelte $c_{ro\frac{t}{2}}$ -Wert von 3×10^{-3} Mol x sec/l stimmt mit früheren Literaturangaben gut überein (A. W. Steegles et al.⁷¹ und B. D. Young et al.⁷²). Mit diesem Wert als Referenz konnte unter der Annahme, daß 9 S RNA zu 100 % Globin-mRNA darstellt, der Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in steady state Kern-RNA, Poly(A)⁺ Kern-RNA, Poly(A)⁻ Kern-RNA und polysomaler RNA mit 0,86 %, 20 %, 0,42 % bzw 1 % ermittelt werden. Aus diesen Werten und der Tatsache, daß durchschnittlich 2 % der steady state Kern-RNA in der Poly(A)⁺ Fraktion enthalten waren, läßt sich errechnen, daß weniger als 50 % der Globin codierenden Sequenzen in der Poly(A)⁺ Kern-RNA und mehr als 50 % in der Poly(A)⁻ Kern-RNA vorhanden sind. Dies entspricht früheren Beobachtungen an unreifen Entenerythrocyten, wo 70 - 80 % der Globin codierenden Sequenzen im Zellkern in nichtpolyadenylierten Molekülen gefunden wurden (G. Spohr et al.⁶³).

In weiteren Experimenten wurde 9 S Globin-mRNA, polysomale RNA und die fraktionierte steady state Kern-RNA im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen in Gegenwart einer ribosomalen Waschfraktion translatiert. Die nachfolgende Produktanalyse zeigte, daß bei der Protein-

biosynthese in Gegenwart von steady state Kern-RNA etwa 20 % der in vitro synthetisierten Proteine Globinketten darstellen. Die höchste Globin codierende Aktivität (Globinkettensynthese zu Gesamtprotein-synthese) wies 9 S Globin-mRNA mit 75,2 % auf, während die Poly(A)⁺ Kern-RNA wie die polysomale RNA etwa zu 70 % Globin codierende Aktivität besaßen. Der entsprechende Wert für Poly(A)⁻ Kern-RNA betrug nur 7,5 %.

Aus diesen Versuchen folgt, daß von der translatierbaren steady state Kern-RNA nur 20 % Globin codierende Sequenzen darstellen, während 80 % unbekannte Proteine codieren. Ob es sich hierbei um funktionelle Proteine handelt oder ob sie durch artifizielle Translation nicht-Protein codierender Sequenzen im zellfreien System entstehen, ist ungeklärt. In der Poly(A)⁺ Kern-RNA kann jedoch eine Anreicherung der Globin codierenden Aktivität bis zu einem Ausmaß beobachtet werden, daß dem für polysomale RNA und 9 S Globin-mRNA entspricht. Berücksichtigt man hierbei jedoch, daß entsprechend den Ergebnissen der Hybridisierungsexperimente in der Poly(A)⁺ Kern-RNA nur 20 % Globin codierende Sequenzen enthalten sind (siehe oben), so muß gefolgert werden, daß der größte Teil der verbleibenden 80 % der RNA im zellfreien Ascites System nicht translatiert wird. Dementsprechend ist unklar, ob es sich hierbei tatsächlich um Protein codierende Sequenzen handelt oder ob aus unbekannten Gründen keine Translation stattfindet.

Um herauszufinden, ob Protein codierende Sequenzen, die auch in anderen Zellen translatiert werden, in der RNA aus unreifen roten Blutzellen und speziell in welchen Fraktionen vorkommen, wurde eine cDNA präpariert, die komplementär zu polysomaler, Poly(A)-haltiger mRNA der Hühnerleber war. Aus den Hybridisierungsreaktionen dieser "Leberprotein-cDNA" mit den RNA-Spezies aus den unreifen roten Blutzellen ging hervor, daß die "Leberprotein-cDNA" zu 50 - 70 % hybridisiert wurde. Das bedeutet, daß ein größerer Teil der "Leberprotein" codierenden Sequenzen in der RNA aus unreifen roten Blutzellen vorliegt. Dieser Befund stimmt mit Untersuchungen an verschiedenen Hühnergeweben

(R. Axel et al.⁷³) und Mäusegeweben (B.D. Young et al.⁷⁴, N.D. Hastie und J.O. Bishop⁷⁵) überein, in denen ein großer Teil der gleichen mRNA-Moleküle einer Spezies in verschiedenen Organen gefunden wurde.

Obwohl $c_{ro}t_{1/2}$ -Werte für diese Reaktionen nur geschätzt werden können, ist den Hybridisierungskurven zu entnehmen, daß der prozentuale Gehalt an "Leberprotein" codierenden Sequenzen in den RNA-Fractionen aus unreifen roten Blutzellen in folgender Reihe abnahm: Poly(A)⁺ Kern-RNA/Kern-RNA/Poly(A)⁻ Kern-RNA/9 S Globin-mRNA/polysomale RNA. Anders dagegen verhält sich die Reihenfolge des Gehalts an Globin codierenden Sequenzen, die in der steady state Kern-RNA und der polysomalen RNA nahezu mit dem gleichen Prozentsatz vorkommen.

Eine Kontamination der "Leberprotein-cDNA" mit Globin-cDNA, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würde, konnte ausgeschlossen werden, da die 9 S Globin-mRNA dann die niedrigeren $c_{ro}t$ -Werte aufweisen müßte, was aber nicht zutraf.

Bei einem geschätzten $c_{ro}t_{1/2}$ -Wert von $5,3 \times 10^2$ Mol x sec/l enthält die Kern-RNA aus den unreifen roten Blutzellen durchschnittlich 0,7 % RNA-Sequenzen, die in der Leber vorkommen. 0,86 % dagegen stellen Globin codierende Sequenzen dar. Die nichtbekannten Proteine unter den Translationsprodukten des zellfreien Ansatzes können demnach zum Teil von diesen RNA-Sequenzen codiert werden. Wie die Globin codierenden Sequenzen sind auch die "Leberprotein" codierenden Sequenzen in der Poly(A)⁺ Kern-RNA angereichert. Nach dem angenommenen $c_{ro}t_{1/2}$ -Wert von 1×10^2 Mol x sec/l sind sie aber nur zu 3,5 % in der Poly(A)⁺ Kern-RNA enthalten. Jedoch unterscheidet sich die Verteilung der "frequency classes" für "Leberprotein" codierende Sequenzen in diesen RNA-Fractionen, wie aus den unterschiedlichen Steigungen der Hybridisierungskurven hervorgeht.

Vergleicht man "Leberprotein" und Globin codierende Sequenzen in den RNA-Fractionen der unreifen roten Blutzellen, so ist der Gehalt dieser Sequenzen in der steady state Kern-RNA nahezu gleich (0,7 % und 0,86 %). Während die "Leberprotein" codierenden Sequenzen in der Poly(A)⁺ Kern-

RNA auf 3,5 % angereichert werden, liegt dieser Wert für die Globin codierenden Sequenzen bei 20 %. Das Verhältnis dieser Werte zu dem Gehalt in der polysomalen RNA (0,18 % bzw. 1 %) ist aber wieder gleich (1 : 20).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Poly(A)⁺ Kern-RNA 2 % und die Poly(A)⁻ Kern-RNA 98 % der steady state Kern-RNA ausmachen, ergeben sich für die Verteilung der in Leberzellen und unreifen roten Blutzellen vorkommenden RNA-Sequenzen auf die Kern-RNA Fraktionen folgende Werte (Tabelle 10):

Tabelle 10

RNA-Sequenzen aus:	steady state Kern-RNA	Poly(A) ⁺ Kern-RNA	Poly(A) ⁻ Kern-RNA
Leberzellen	100 %	10 %	90 %
unreife rote Blut- zellen	100 %	49,3 %	50,7 %

Aus der Tabelle geht hervor, daß in der Poly(A)⁻ Fraktion der größte Teil der RNA-Sequenzen aus Leberzellen enthalten ist.

Sowohl durch die Translationsexperimente als auch durch die Hybridisierungsexperimente konnte gezeigt werden, daß der Anteil an Globin codierenden Sequenzen in der steady state Kern-RNA niedriger ist als in der Poly(A)⁺ Fraktion. Deshalb ist zu vermuten, daß die Polyadenylierung der primären Transcriptionsprodukte im Zellkern mit der Selektion der zu translatierenden mRNA parallel läuft. Da in der Poly(A)⁺ Kern-RNA neben den Globin codierenden Sequenzen aber noch ein großer Teil anderer Sequenzen vorkommt, der weder in das Cytoplasma gelangt noch translatiert wird, ist es nicht sicher, daß die Polyadenylierung den einzig entscheidenden Kontrollmechanismus darstellt. Schließlich ist auch bekannt, daß Histon-mRNA ohne das Anhängen einer Poly(A)-Sequenz in das Cytoplasma transportiert und dort translatiert wird (M. Adesnik et al.³⁶). Wahrscheinlich existieren noch weitere Regel-

mechanismen, die mRNA Moleküle erkennen können, sie vor einer Degradierung schützen und aus dem Zellkern schleusen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Um festzustellen, ob im Zellkern ein höhermolekularer Precursor für Globin-mRNA nachzuweisen ist, wurden steady state Kern-RNA und polysomale RNA aus unreifen roten Hühnerblutzellen isoliert und durch Zentrifugation in Formamid-Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Zum Vergleich wurde die Verteilung von 9 S Globin-mRNA durch Gradientenzentrifugation von ^{125}J od markierter mRNA untersucht. Zur Ermittlung der Verteilung von Poly(A)-Sequenzen und Globin codierenden Sequenzen wurden sowohl die steady state Kern-RNA als auch die polysomale RNA nach der Gradientenzentrifugation mit ^3H -Poly(U) oder ^3H -markierter DNA, die in vitro komplementär zu 9 S Globin-mRNA (Globin-cDNA) synthetisiert worden war, hybridisiert. Außerdem wurde die RNA nach der Gradientenzentrifugation jeweils in zwei Fraktionen ($< 20\text{ S}$ und $> 20\text{ S}$) geteilt, im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Tumorzellen translatiert und die Menge der Globinketten in den Translationsprodukten ermittelt.

Durch keine der genannten Methoden konnten Anhaltspunkte für die Existenz einer höhermolekularen RNA als Precursor für Globin-mRNA gefunden werden.

Weitere Analysen wurden durch Elektrophorese von RNA auf exponentiellen Polyacrylamid-Gelen in Formamid und Hybridisierung mit cDNA durchgeführt. Die Ergebnisse - wie auch die Gradientenzentrifugation - zeigten, daß die Verteilung von Globin codierenden Sequenzen in steady state Kern-RNA mit der Verteilung von cytoplasmatischer 9 S Globin-mRNA übereinstimmt.

Unter der Annahme, daß ein Globin-mRNA Precursor, sofern er überhaupt existiert, möglicherweise sehr schnell in mRNA umgewandelt wird und deshalb nur in der kleinen Fraktion der neusynthetisierten RNA nachzuweisen ist, wurde ^3H -Uridin oder ^3H -Adenosin pulsmarkierte Kern-RNA aus unreifen roten Hühnerblutzellen isoliert und ebenfalls in

Formamid-Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Durch die Hybridisierung dieser pulsmarkierten, neusynthetisierten Kern-RNA mit unmarkierter Globin-cDNA und einer nachfolgenden Inkubation mit RNAase A und RNAase T₁ konnten Globin codierende RNA-Moleküle mit unterschiedlichen Sedimentationswerten gefunden werden. Diese Moleküle sedimentierten bei 9 S und ungefähr bei 15 S, wobei die Globin codierende 15 S Kern-RNA wahrscheinlich einen Precursor von 9 S Globin-mRNA darstellt.

Poly(A)-Sequenzen konnten in der Globin codierenden 15 S Kern-RNA auf zwei Wegen nachgewiesen werden. ³H-Uridin pulsmarkierte Kern-RNA wurde an einer Poly(U)-Sephrose Säule chromatographiert. Etwa 50 % des 15 S Precursors waren dabei in der Poly(A)⁺ Fraktion enthalten.

Im zweiten Versuch wurde ³H-Adenosin markierte 15S Kern-RNA mit Globin-cDNA hybridisiert, mit RNAase A und RNAase T₁ inkubiert und an einer Hydroxylapatit Säule chromatographiert. Die Hybride wurden eluiert und geschmolzen. Nach einer weiteren Inkubation mit DNAase I, RNAase A und RNAase T₁ konnten Poly(A)-Sequenzen mit einer durchschnittlichen Länge von 100 Nukleotiden isoliert werden. Die Poly(A)-Sequenzen dieser 15 S Kern-RNA konnten vollständig durch RNAase T₂ degradiert werden.

Durch Hybridisierung mit ³H-markierter Globin-cDNA konnte der Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in der gesamten steady state Kern-RNA, Poly(A)⁺ Kern-RNA, Poly(A)⁻ Kern-RNA und polysomalen RNA mit 0,86 %, 20 %, 0,42 % bzw. 1 % bestimmt werden. Mehr als 50 % aller Globin codierenden Sequenzen waren in der Poly(A)⁻ Kern-RNA enthalten. Die Translation der RNA-Spezies im zellfreien System ergab eine Anreicherung an Globinketten zu den gesamten Proteinen von 20 % in der steady state Kern-RNA auf mehr als 70 % in der Poly(A)⁺ Kern-RNA.

Wie Hybridisierungsexperimente mit ³H-markierter "Leberprotein-cDNA" zeigten, waren "Leberprotein" codierende Sequenzen in den RNA-Fractionen der unreifen roten Blutzellen vorhanden. Diese Sequenzen waren zu 90 % auf die Poly(A)⁻ Fraktion und nur zu 10 % auf die Poly(A)⁺ Frak-

tion verteilt. Aus diesen Experimenten sowie aus dem Gehalt an Globin codierenden Sequenzen in der Poly(A)⁺ Fraktion (20 %, siehe oben) kann man vermuten, daß in den differenzierten roten Blutzellen die Polyadenylierung an der Selektion zu translatierender RNA-Moleküle aus den primären Transcriptionsprodukten beteiligt ist. Es müssen aber noch weitere Regelmechanismen existieren, die mRNA-Moleküle erkennen können sie vor einer Degradierung schützen und aus dem Zellkern schleusen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 G.P.Georgiev, O.P.Samarina, M.J.Lerman, M.N.Smirnov und A.N.Severitzov (1963) Nature 200, 1291-1294
- 2 K.Scherrer, H. Latham und J.E.Darnell (1963) Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 49, 240-248
- 3 R.Soeiro, H.C.Birnboim und J.E.Darnell (1966) J.Mol.Biol. 19, 362-372
- 4 R.Soeiro, M.H.Vaughan, J.R.Warner und J.E.Darnell (1968) J.Cell Biol. 39,112-118
- 5 S.Penman, C.Vesco und M.Penman (1968) J.Mol.Biol. 34, 49-69
- 6 J.E.Darnell, L.Phillipson, R.Wall und M.Adesnik (1971) Science 174, 507-510
- 7 J.R.Greenberg und R.P.Perry (1971) J.Cell Biol. 50, 774-786
- 8 M.Edmonds, M.H.Vaughan jr und H.Nakazato (1971) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S. 68, 1336-1340
- 9 J.R.Greenberg und R.P.Perry (1972) J.Mol.Biol. 72, 91-98
- 10 J.E.Darnell, R.Wall und R.J.Tushinski (1971) Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 68, 1321-1325
- 11 R.P.Perry und D.E.Kelley (1974) Cell 1, 37-42
- 12 R.P.Perry und D.E.Kelley (1975) Cell 6, 13-19
- 13 Y.Furuichy, M.Morgan, A.Shatkin, W.Jelinek, M.Salditt-Georgieff und J.E.Darnell (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.U. S. 72, 1904-1908
- 14 J.E.Darnell (1968) Bacteriol.Rev. 32, 262-290

- 15 J.E.Darnell, G.N.Pagoulatos, U.Lindberg und R.Balint (1970)
Cold Spring Harbour Symp.Quant.Biol. 35, 555-560
- 16 F.Jacob und J.Monod (1961) J.Mol.Biol. 3, 318-356
- 17 J.E.Darnell, R.W.Jelinek und G.R.Molloy (1973) Science 181,
1215-1221
- 18 T.Imaizumi, H.Diggelmann und K.Scherrer (1973) Proc.Natl.Acad.
Sci.U.S. 70, 1122-1126
- 19 A.Ruiz-Carillo, M.Beato, G.Schütz, P.Feigelson und V.G.Allfrey
(1973) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 70, 3641-3645
- 20 R.Williamson, C.E.Drewienkiewicz und J.Paul (1973) Nat.New
Biol.241, 66-68
- 21 G.S.McKnight und R.T.Schimke (1974) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.
11, 4327-4331
- 22 P.M.Lizardi (1976) Cell 7, 239-245
- 23 D.Kabat (1975) J.Biol.Chem. 250, 6085-6092
- 24 W.Knöchel und H.Tiedemann (1975) Biochim.Biophys.Acta 378,
383-393
- 25 S.R.de Kloet, V.S.Mayo und B.A.G.Andrean (1974) Arch.Bio-
chem.Biophys. 162, 313-316
- 26 J.H.Maxwell (1976) Biochem.J. 153, 509-512
- 27 S.Penman. M.Rosbach und M.Penman (1970) Proc.Natl.Acad.
Sci.U.S. 67, 1878-1885
- 28 K.M.Rose, L.E.Bell und S.T.Jacob (1977) Nature 267, 178-180
- 29 S.G.Sawicki, W.Jelinek und J.E.Darnell (1977) J.Mol.Biol. 113,
219-235
- 30 "No role yet for poly(A)" (1974) Nature 248, 102

- 31 D. Sheiness und J. E. Darnell (1973) *Nat. New Biol.* 241, 265-268
- 32 R. E. Pemberton und C. Baglioni (1973) *J. Mol. Biol.* 81, 255-260
- 33 G. Huez, G. Marbaix, A. Burny, E. Hubert, M. Leclerco, Y. Cleuter, H. Chantrenne, H. Soreo und U. Z. Littauer (1977) *Nature* 266, 473-474
- 34 E. Bard, D. Efron, A. Marcus und R. P. Perry (1974) *Cell* 1, 101-106
- 35 R. F. Munoz und J. E. Darnell (1974) *Cell* 2, 247-252
- 36 M. Adesnik und J. E. Darnell (1972) *J. Biol. Mol.* 67, 397-406
- 37 H. Schall und F. Turba (1963) *Biochem. Zeitschr.* 339, 219-223
- 38 J. R. Warner, R. Soeiro, H. C. Birnboim, M. Girard und J. E. Darnell (1966) *J. Mol. Biol.* 19, 349-361
- 39 D. S. Holmes und J. Bonner (1973) *Biochemistry* 12, 2330-2338
- 40 H. Aviv und P. Leder (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 1408-1412
- 41 U. Lindberg und T. Person (1974) *Methods Enzymol.* 34, 496-499
- 42 W. Knöchel (1974) *Mol. Biol. Rep.* 1, 311-320
- 43 Y. Suzuki, L. P. Gage und D. D. Brow (1972) *J. Mol. Biol.* 70, 637-649
- 44 M. E. Mirault und K. Scherrer (1971) *Eur. J. Biochem.* 23, 372-386
- 45 G. Spohr, M. E. Mirault, T. Imaizumi und K. Scherrer (1976) *Eur. J. Biochem* 62, 313-322
- 46 A. Berns, P. Jansen und H. Bloemendal (1974) *FEBS Lett.* 47, 343-347
- 47 A. Cann, R. Gambino, J. Banks und A. Bank (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7536-7540
- 48 P. R. Harrison, B. D. Birnie, A. Hell, S. Humphries, B. D. Young und J. Paul (1974) *J. Mol. Biol.* 84, 539-554

- 49 J. Ross (1976) J. Mol. Biol. 106, 403-420
- 50 R. J. Britten, D. E. Graham und B. R. Neufeld (1974) Methods Enzymol. 29, 363-418
- 51 H. Bloemendal, E. L. Benedetti und W. S. Bont (1974) Methods Enzymol. 30, 313-327
- 52 M. Mathews und A. Korner (1970) Eur. J. Biochem. 17, 328-338
- 53 W. Knöchel, D. Hendrick, S. Schröter und H. Tiedemann (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1389-1394
- 54 S. M. Heywood (1969) Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 34, 799-803
- 55 R. E. Lockard und J. B. Lingrel (1971) Nat. New Bio. 233, 204-206
- 56 G. Shapira, J. Rosa, N. Maleknia und P. Padien (1968) Methods Enzymol. 12B, 749-750
- 57 D. Hendrick, W. Knöchel, W. Schwarz, S. Pitzel und H. Tiedemann (1974) Develop. Biol. 36, 299-310
- 58 K. Scherrer, L. Marcaud, F. Zajdela, I. M. London und F. Gros (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56, 1571-1578
- 59 G. Attardi, H. Parnas und B. Attardi (1970) Exp. Cell Res. 62, 11-31
- 60 S. Schröter, Dissertation, Freie Universität Berlin, Berlin (1976)
- 61 W. Knöchel, D. Lange und D. Hendrick (1976) Mol. Biol. Rep. 3, 143-150
- 62 A. G. Stewart, E. S. Gander, C. Morel, B. Luppis und K. Scherrer (1973) Eur. J. Biochem. 34, 205-212
- 63 G. Spohr, G. Dettori und V. Manzari (1976) Cell 8, 505-512
- 64 M. MacNaughton, K. B. Freeman und J. O. Bishop (1974) Cell 1, 117-125

- 65 P.J.Curtis und C.Weissmann (1976) J. Mol.Biol. 106, 1061-1075
- 66 S.P.Kwan, T.G.Wood und J.B.Lingrel (1977) Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 74, 178-182
- 67 R.N.Bastos und H.Aviv (1977) Cell 11, 641-650
- 68 P.J.Curtis, N.Mantei, J.van den Berg und C.Weissmann (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 74, 3184-3188
- 69 R.C.Molloy, M.B.Sporn, D.E.Kelley and R.P.Perry (1972) Biochemistry 11, 3256-3260
- 70 R.Sheldon, J.Kates, D.E.Kelley und R.P. Perry (1972) Biochemistry 11, 3829-3834
- 71 A.W.Steegles, G.N.Wilson, J.A.Kantor, D.J.Picciano, A.K. Falvey und W.F.Anderson (1974) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 71, 1219-1223
- 72 B.D.Young, P.R.Harrison, R.S.Gilmour, G.D.Birnie, A.Hell, S.Humphries und J.Paul (1974) J. Mol. Biol. 84, 555-568
- 73 R.Axel, P.Feigelson und G.Schütz (1976) Cell 7, 247-254
- 74 B.D.Young, G.D.Birnie und J.Paul (1976) Biochemistry 15, 2823-2829
- 75 N.D.Hastie und J.O.Bishop (1976) Cell 9, 761-774

Lebenslauf

Am 27.01.1951 wurde ich, Ulrich Grundmann, als zweiter Sohn des Beamten Günter Grundmann und seiner Ehefrau Edith, geborene Holleufer, in Berlin geboren.

Von Ostern 1957 an besuchte ich die 8. Grundschule in Berlin-Steglitz und wechselte danach auf das Lilienthal-Gymnasium. Dort bestand ich im Januar 1971 die Reifeprüfung.

Zum Sommersemester 1971 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Biologie. 1973 bestand ich die Vordiplomprüfung und im Sommer 1975 die Diplomhauptprüfung mit einer Diplomarbeit über die "Isolierung und Charakterisierung von mRNA aus Hefezellen".

Seit Oktober 1975 bin ich Doktorand bei Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin.

